



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

**MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE  
PÚBLICA**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO GELO USADO EM  
ESTABELECIMENTOS DE RESTAURAÇÃO E DE BEBIDAS**

Trabalho submetido por  
**Gonçalo Manuel Rosa Candeias**  
para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde  
Pública

Trabalho orientado por  
**Mestre Maria Isabel da Silva Santos**

**novembro de 2014**

## **Agradecimentos**

Este projeto apesar de partir de uma ideia da minha autoria, para o concretizar além do apoio dado por muitas pessoas, foi preciso que acreditassem que este estudo, para além de servir para realização desta dissertação de mestrado, também seria e traria informação útil para a entidade onde foi desenvolvido.

Mestre Isabel Santos (a minha orientadora) a primeira pessoa a quem apresentei a ideia, um GRANDE e SINCERO obrigado pelo apoio, disponibilidade e ensinamentos prestados durante a realização desta dissertação. Estou-lhe eternamente grato pela paciência, pelas horas ao telefone, por me fazer acreditar que era possível e assim como por todos os incentivos.

O meu obrigado à Dr.<sup>a</sup> Filomena Araújo, Diretora do Departamento de Saúde Pública e Planeamento da Administração Regional de Saúde Pública IP (ARSA), que autorizou a realização deste projeto.

Um agradecimento a toda a equipa do Laboratório de Saúde Pública de Évora da ARSA pela disponibilidade, em especial à Responsável do Laboratório Dr.<sup>a</sup> Margarida Passanha e à minha colega Susana Dias, pela liberdade dada para a elaboração deste projecto, o apoio e puxões de orelhas dados durante a realização da dissertação.

Aos Técnicos de Saúde Ambiental do Agrupamento de Centros de Saúde do Alentejo Central pela disponibilidade mostrada.

Ao meu grande amigo de infância Rafael Carvalho, pela preciosa ajuda na análise estatística dos dados.

Um especial obrigadão à Isabel e à Carolina, que numa fase tão importante para nós, tiveram força e determinação para me dar espaço e tempo para terminar a dissertação.

Obrigado mãe pelo apoio dado durante esta fase.

Finalmente a todos os meus amigos e familiares pela força e apoio que me deram ao longo destes anos e pela paciência para me ouvirem mas acima de tudo por me fazerem acreditar que era possível chegar ao fim.

Um sincero obrigado a todos!

## Resumo

O gelo tem sido utilizado em associação a alimentos e bebidas, a fim de conservá-los ou refrigerá-los. Como qualquer alimento, o gelo assume importante papel na disseminação de agentes infecciosos causadores de doenças. A contaminação pode ser proveniente da matéria-prima ou quando as regras de boas práticas de higiene e segurança alimentar não são respeitadas.

Em Portugal, as empresas de produção de gelo, por norma, utilizam o Decreto-Lei n.º 306/2007 para verificar a qualidade do seu produto, associado a boas práticas de higiene ao longo de todo o processo. Na restauração, a produção/utilização de gelo, na maioria dos casos, não é controlada.

Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar a qualidade microbiológica do gelo em estabelecimentos de restauração e bebidas na cidade de Évora e identificar potenciais riscos para a saúde associados ao consumo de gelo. Foram analisadas 31 amostras, tendo sido avaliados os parâmetros microbiológicos requeridos pelo Decreto-Lei e adicionalmente executaram-se os parâmetros *Pseudomonas aeruginosa*, Total de Estafilococos e Estafilococos Coagulase Positiva (indicadores de contaminação inter-humana).

Verificou-se que 25,8% das amostras não se encontravam conformes com os requisitos microbiológicos definidos pelo Decreto-Lei. A pesquisa adicional de *P. aeruginosa* e Estafilococos Coagulase Positiva (ambos patogénicos, devendo estar ausentes na água/gelo) permitiu concluir que 41,9% das amostras não apresentaram conformidade exigida para consumo humano. Os parâmetros mais frequentes a não satisfazerem a legislação foram Bactérias Coliformes e Enterococos (19,4%), seguidos por *P. aeruginosa* e Estafilococos Coagulase Positiva (9,7%). *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* apenas foram detetados numa amostra cada.

Verificou-se que a maioria dos requisitos de segurança alimentar nos estabelecimentos analisados apresentava 100% de conformidade. Não se conseguiu estabelecer nenhuma relação estatisticamente significativa entre a qualidade microbiológica do gelo e os vários itens estudados.

Os resultados indicaram que as amostras analisadas apresentam um risco para a saúde dos consumidores.

Palavras Chave: Qualidade Microbiológica do gelo, Restauração e Bebidas, *Pseudomonas aeruginosa* e Estafilococos.

## Abstract

Ice has been used, in association with food and drinks, with the objective of conserving or cooling them. As with any food, ice assumes an important role in the dissemination of infectious agents responsible for causing diseases. The contamination may be prevented from the source (prime-matter) or it may appear when the proper methodologies, regarding the hygiene and food safety, aren't applied.

In Portugal, most of the ice producing companies use the article nº 306/2007 under the national legislation to verify the quality of their product, associated with the correct hygiene methodologies for the whole process of the production. In the restaurant sector, the production of the ice for own use isn't, for the most cases, regulated.

With the current study, it was intended to evaluate the microbiological quality of the ice in restaurants and drinking establishments in the city of Évora and to identify potential health hazards associated to the ice consumed in such establishments. 31 samples have been analyzed and evaluated, under the microbiological parameters required by the article previously referred, and furthermore *Pseudomonas aeruginosa*, Total Staphylococci and Coagulase-Positive Staphylococci parameters were performed (indicators of inter-human contamination).

It has been verified that in 25,8% of the samples, weren't up to the microbiological requirements stipulated by the national legislation. The additional search of *P. aeruginosa* and Coagulase-Positive Staphylococci (both pathogenic, therefore, shouldn't be in the water/ice) led to the conclusion that 41,9% of the samples didn't satisfied to requirements for human consumption. The most frequent parameters out of legislation were, *Coliforms* and *Enterococci* (19,4%), followed by *P. aeruginosa* and Coagulase-Positive Staphylococci (9,7%). *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* were only detected in one sample.

Most of the food safety requirements verified in the establishments, showed an approval rate of 100%. It wasn't possible to establish a statistically strong relation between the microbiological quality of the ice and the many items evaluated.

The results show that the tested samples represent a risk to consumers' health.

Key Words: Microbiological quality of the ice, Restaurant sector and drinks, *Pseudomonas aeruginosa* and Staphylococci.

## Índice

Agradecimentos .....	2
Resumo .....	3
Abstract.....	4
Índice .....	5
Índice de Figuras .....	7
Índice de Tabelas .....	8
Abreviaturas.....	10
I. Introdução.....	12
1. Segurança alimentar .....	12
2. Doenças de origem alimentar .....	13
2.1. Incidência de doenças de origem alimentar na Europa.....	14
2.1.1. Doenças de origem alimentar veiculadas pela água.....	16
2.2. Incidência de doenças de origem alimentar em Portugal .....	17
3. O Gelo .....	19
3.1. Matéria Prima, a água .....	19
3.2. O gelo como alimento .....	20
3.3. Fabrico/Produção do gelo .....	21
3.4. Qualidade do gelo - requisitos microbiológicos.....	24
3.5. Estado da arte - estudos sobre a qualidade do gelo .....	26
3.5.1. Surtos de doenças associados à qualidade do gelo.....	30
4. Parâmetros microbiológicos .....	32
4.1. Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36 °C .....	32
4.2. Bactérias Coliformes e <i>E. coli</i> .....	32
4.3. Enterococos Intestinais.....	33
4.4. <i>Clostridium perfringens</i> .....	34
4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
4.6. Estafilococos .....	35
5. Objetivos.....	36
II. Materiais e Métodos.....	37
1. Descrição do estudo.....	37
2. Entidade onde se desenvolveu o estudo .....	37
3. Universo do estudo .....	39

4. Amostras ensaiadas .....	40
5. Metodologia.....	41
5.1. Amostragem .....	41
5.2. Parâmetros “ <i>in loco</i> ” ou de campo .....	41
5.3. Parâmetros laboratoriais - microbiológicos .....	41
5.3.1. Método de incorporação.....	43
5.3.2. Método de filtração por membrana .....	44
5.3.2.1. Pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes e <i>Escherichia coli</i> .....	45
5.3.2.2. Pesquisa e quantificação de Enterococos Intestinais .....	48
5.3.2.3. Pesquisa e quantificação de <i>Clostridium perfringens</i> .....	49
5.3.2.4. Pesquisa e quantificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	51
5.3.2.5. Pesquisa e quantificação de Total de Estafilococos e Estafilococos Coagulase Positiva .....	53
5.4. Ficha de caracterização de campo.....	55
5.5. Análise estatística.....	56
III. Resultados e Discussão.....	58
1. Avaliação global dos resultados microbiológicos do gelo .....	58
2. Distribuição dos resultados (istogramas de frequência).....	60
3. Avaliação da qualidade microbiológica do gelo de acordo com o Decreto-Lei n.º 306/2007 .....	63
4. Avaliação dos resultados em função dos critérios microbiológicos definidos por outras entidades internacionais .....	66
5. Análise da conformidade das amostras de gelo em função do tipo de estabelecimento e método de produção do gelo .....	67
6. Análise da conformidade dos resultados de Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36 °C, em função do tipo de estabelecimento e método de produção do gelo .....	70
7. Análise dos parâmetros de campo: Cloro e pH .....	72
8. Análise dos questionários/fichas de campo .....	78
8.1. Avaliação dos requisitos gerais de caracterização dos estabelecimentos .....	78
8.2. Verificação de boas práticas de produção e manuseamento de gelo .....	79
IV. Conclusões .....	89
V. Referências Bibliográficas.....	93
Anexos.....	101

## Índice de Figuras

Figura 1- Sistema de Filtração por Membrana (Fonte: autor).....	44
Figura 2 - Colónias características de Bactérias Coliformes/ <i>E. coli</i> em meio MLSA (Fonte: autor).....	46
Figura 3 - Teste da fermentação da lactose em meio Fluorocult (Tubo em cima-fermentação negativa; Tubo em baixo-fermentação positiva) (Fonte: autor) .....	47
Figura 4 – Meio de Fluorocult: Teste positivo para a Fluorescência (foto da esquerda); Teste do indol (foto da direita), em que o tubo do lado direito corresponde a teste positivo e tubo do lado esquerdo, a teste negativo (Fonte: autor).....	47
Figura 5 - Colónias características de Enterococos Intestinais em meio <i>Slanetz and Bartley</i> (Fonte: autor) .....	48
Figura 6 - Colónias características de <i>P. aeruginosa</i> em meio <i>CN Agar</i> (Fonte: autor) .....	52
Figura 7 - Colónias características de Estafilococos em meio <i>MSA</i> (Fonte: autor) .....	53
Figura 8 - Meio de <i>MEVAG</i> : Tubo do lado esquerdo - teste negativo; Tubo do lado direito - teste positivo (Fonte: autor) .....	54
Figura 9 – Teste de Coagulase positivo em meio <i>Coagulase Plasma, Rabbit with EDTA</i> (Fonte: autor).....	55
Figura 10 - Histograma dos resultados obtidos para Microrganismos a 22°C .....	61
Figura 11 - Histograma dos resultados obtidos para Microrganismos a 36 °C .....	61
Figura 12 - Histograma dos resultados obtidos para Total de Estafilococos .....	62
Figura 13 - Periodicidade da execução do plano de limpeza e higienização da máquina em função da qualidade microbiológica do gelo .....	82
Figura 14 - Distribuição das amostras pelo tempo decorrido entre a última execução do plano de limpeza e higienização da máquina em função da qualidade microbiológica do gelo .....	83

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Surto com agente etiológico identificado de 2008 a 2013.....	18
Tabela 2 - Resumo dos parâmetros e respectivos valores paramétricos associados à qualidade microbiológica do gelo e/ou água para consumo humano.....	25
Tabela 3 - Distribuição das amostras colhidas em função do tipo de estabelecimento e método de produção de gelo.....	41
Tabela 4 - Parâmetros microbiológicos e respectivos métodos utilizados na determinação destes parâmetros nas amostras de gelo .....	42
Tabela 5 - Características do método descrito na ISO 6222:1999, respectivo volume inoculado e amplitude de resultados.....	43
Tabela 6 - Características do método de filtração por membrana e respectivo volume filtrado e amplitude de resultados.....	45
Tabela 7 - Resumo estatístico dos valores obtidos para os parâmetros microbiológicos	60
Tabela 8 – Frequência das amostras não conformes de acordo com o incumprimento .	64
Tabela 9 – Frequência dos parâmetros Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36 °C com resultados acima do Valor Recomendado.....	65
Tabela 10 – Distribuição das frequências globais das amostras com resultados de Microrganismos Cultiváveis superiores ao Valor de Referência em função da sua conformidade .....	65
Tabela 11 - Frequência das amostras com incumprimento em função dos critérios estabelecidos por diferentes entidades (excluindo os parâmetros recomendados).....	67
Tabela 12 - Distribuição das amostras pelo tipo de estabelecimento em função da qualidade microbiológica do gelo.....	68
Tabela 13- Distribuição das amostras pelo método de produção de gelo em função da qualidade microbiológica do gelo.....	69
Tabela 14 - Distribuição dos tipos de incumprimentos em função do tipo de estabelecimento e do método de produção de gelo .....	70
Tabela 15- Distribuição das amostras pelo tipo de estabelecimento em função da conformidade dos valores de Microrganismos a 22 °C e a 36 °C.....	71
Tabela 16 - Distribuição das amostras pelo método de produção de gelo em função da conformidade dos valores de Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36 °C .....	71
Tabela 17 - Resumo estatístico dos valores obtidos para os parâmetros de campo .....	73

Tabela 18- Avaliação/Conformidade dos valores obtidos para o cloro residual e pH em amostras de água de abastecimento e no gelo (produzido pelos próprios estabelecimentos) de acordo com o definido pelo Decreto- Lei n.º 306/2007 .....	74
Tabela 19 – Frequência das amostras de acordo com a conformidade do valor do cloro residual (água de abastecimento e gelo) em função da qualidade microbiológica do gelo .....	75
Tabela 20 - Frequência das amostras de acordo com a conformidade do valor do cloro residual (água de abastecimento e gelo) em função da conformidade dos valores de Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36 °C.....	76
Tabela 21- Valores obtidos através do teste de correlação <i>Spearman</i> ( <i>r</i> e <i>p-value</i> ) entre e o valor de cloro residual (água e gelo) e os resultados dos parâmetros microbiológicos	77
Tabela 22 – Frequência de conformidade dos vários requisitos analisados em função da qualidade das amostras de gelo associadas e classificadas como não conformes.....	79
Tabela 23 – Caracterização das máquinas de produção de gelo em função da conformidade das amostras de gelo.....	80
Tabela 24- Distribuição das amostras de acordo com a localização da máquina produção de gelo e a sua conformidade microbiológica .....	81
Tabela 25 – Distribuição das amostras de acordo com a existência de plano de limpeza e higienização da máquina de produção de gelo e a sua conformidade microbiológica...	81
Tabela 26 - Distribuição das amostras de acordo com a local de conservação do gelo e a sua conformidade microbiológica de acordo com o Decreto-Lei n.º306/2007 .....	84
Tabela 27- Distribuição das amostras pelo local onde é guardado o utensílio para fornecer o gelo e a conformidade microbiológica do gelo .....	86
Tabela 28 - Distribuição da periodicidade com que se realiza a limpeza e higienização do utensílio usado para fornecer o gelo ao cliente em função da sua conformidade microbiológicos do gelo .....	86

## Abreviaturas

- AFDO – *Association of Food and Drug Officials*
- ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
- ARSA - Administração Regional de Saúde do Alentejo, IP
- ARSN - Administração Regional de Saúde do Norte, IP
- BPF – Boas Práticas de Fabrico
- BPL – Boas Práticas de Laboratório
- CAC – *Codex Alimentarius Commission*
- CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*
- DGS – Direção Geral de Saúde
- DL – Decreto-Lei
- DOA – Doenças de Origem Alimentar
- EA – *Environment Agency*
- ECDC - *Centre for Disease Prevention and Control*
- EFSA - *European Food Safety Authority*
- ERSAR – Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
- Estafilococos C+ - Estafilococos Coagulase Positiva
- EUA – Estados Unidos da América
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FEHD – *Food and Environmental Hygiene Department*
- FSAI - *Food Safety Authority of Ireland*
- HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Point*
- HPA – *Health Protection Agency*
- ICMSF- *Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods*
- INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
- IPAC – Instituto Português de Acreditação
- IPIA – *International Packaged Ice Association*
- IRAR – Instituto Regulador de Águas e Resíduos
- ISO – *Internacional Standard Organization*
- MC – Microrganismos Cultiváveis
- MLSA – *Membrane Lauryl Sulphate Agar*
- MSA – *Mannitol Salt Agar*
- MUG - 4-metil-lumbeliferil- $\beta$ -D-glucuronidase

- NP – Norma Portuguesa
- PHE – *Public Health England*
- r – coeficiente de correlação
- TSC – Triptose –Sulfito Cicloserina
- VP – Valor Paramétrico
- VR – Valor Recomendado
- VTEC – Grupo patogénico de *Escherichia coli* produtor de verotoxinas
- WAFMP - *Western Australian Food Monitoring Program*
- WHO – *World Health Organization*
- YEA – *Yeast Extract Agar*

## **I. Introdução**

### **1. Segurança alimentar**

Todo o Ser Humano tem o direito de esperar que os alimentos (incluindo a água) que consome sejam inócuos e aptos para consumo. As doenças de origem alimentar (DOA) são prejudiciais para a saúde das populações, podendo mesmo ser fatais. Contudo existem outros fatores negativos associados a estas doenças visto que podem ser uma causa de redução na produtividade económica, prejudiciais para o comércio e turismo, conduzindo ao encerramento de estabelecimentos e desemprego. A deterioração dos alimentos, que serão desperdiçados, afetam negativamente o comércio e a confiança dos consumidores (*Codex Alimentarius Commission* (CAC), 2003; Correia et al., 2013).

O desenvolvimento da sociedade, acompanhado pelo aumento de estruturas onde se manipulam alimentos e o conseqüente alargamento entre as fases de produção e do consumo, proporciona um maior número de situações de manipulação devido às múltiplas oportunidades de contaminação. Atualmente os géneros alimentícios são cada vez mais feitos à escala mundial, o que pode resultar num aumento da população exposta a doenças se ocorrer alguma contaminação em qualquer uma das fases. Deste modo torna-se imprescindível um controlo eficaz, de modo a prevenir doenças e a suas conseqüências na saúde. Todos os intervenientes, incluindo produtores, manipuladores e consumidores têm a responsabilidade de assegurarem que os alimentos são seguros para consumo (Brandão, 2002; CAC, 2003; Santos & Cunha, 2007).

Segundo a *World Health Organization* (WHO) e apesar dos esforços das entidades governamentais em melhorar a segurança na cadeia alimentar, estima-se que anualmente, milhões de pessoas por todo o mundo sejam afetadas por doenças transmitidas pelos alimentos, tanto em países em desenvolvimento, como em países desenvolvidos (WHO, 1999).

A segurança alimentar surge actualmente como uma das principais preocupações na Saúde Pública e é definida como a garantia de que o alimento não provocará danos ao consumidor quando preparado e/ou consumido de acordo com o uso recomendado. Contudo é fácil compreender, que é possível ocorrer contaminação de origem biológica, química e/ou física ao longo de todo o processo associado, desde a produção até ao seu consumo (CAC, 2003, Duarte, 2010).

De modo a oferecer produtos com garantias ao nível de segurança alimentar é necessário a identificação dos perigos e estabelecer mecanismos de intervenção, sendo

necessário o conhecimento da presença e distribuição dos agentes patogénicos ao longo de toda a cadeia alimentar (Correia et al., 2013). Na maioria dos casos esta garantia é conseguida através da implementação de sistema *Hazard Analysis and Critical Control Point* (HACCP) – Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos, assente num programa de Pré-requisitos (CAC, 2003).

## **2. Doenças de origem alimentar**

As DOA são definidas pela WHO como doenças infecciosas ou tóxicas, proveniente, ou que se presume, pelo consumo de alimentos ou de água contaminados (WHO, 2003).

“As toxinfecções alimentares, é termo frequentemente utilizado para englobar as infecções alimentares, que ocorrem quando se ingere um alimento contaminado com um microrganismo patogénico que é capaz de crescer no tracto gastrointestinal, e as intoxicações alimentares, que resultam da ingestão de alimentos onde previamente cresceram bactérias ou outros microrganismos que produziram toxinas que acabam por ser ingeridas juntamente com o alimento” (Veiga et al., 2009).

As toxinfecções alimentares, são um grave problema em saúde pública, constituindo uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, particularmente para grupos populacionais de risco, onde se incluem: idosos, crianças, grávidas e imunocomprometidos (Correia et al., 2013; Viegas et al., 2014).

As toxinfecções alimentares na sua maioria são caracterizadas como doença com manifestação suave e/ou autolimitada, geralmente tratadas em ambulatório (Viegas et al., 2014), contudo em determinadas situações podem causar doenças crónicas a agudas, de manifestações variadas, tais como: neurológicas, cardíacas, renais, articulares, fetais, endócrinas, imunológicas e gastrointestinais (sendo estas últimas, as mais comuns). Os casos extremos podem levar à falência de vários órgãos e mesmo à morte (Correia et al., 2013).

Este problema de saúde pode ser ampliado a nível mundial e explicado, entre outros fatores, pela globalização do aumento da mobilidade das populações e do comércio internacional de alimentos, assim como alterações dos hábitos alimentares (Brandão 2002; Santos & Cunha, 2007; Calhau, 2014).

Nos dias de hoje, facilmente um problema de saúde pública local é transformado num incidente internacional, com consequências graves (Santos, 2009; Calhau, 2014). Exemplo dessa globalidade foi o surto de *Escherichia coli* O104:H4, que ocorreu em

2011 na Alemanha que abalou a economia e a confiança do consumidor, tendo sido registado ocorrências em vários países, dentro e fora da União Europeia (Saraiva, 2011; Calhau, 2014).

As estimativas indicam que aproximadamente 90% das DOA são originadas por microrganismos, que podem ser encontrados na maioria dos alimentos mas a sua transmissão ao Homem resulta sobretudo de práticas erradas nas últimas etapas de confeção e/ou distribuição. Ainda de acordo com as estimativas efetuadas, as DOA são 300 a 350 vezes mais frequentes do que as DOA declaradas, afectando uma em cada três pessoas anualmente. Estima-se que cerca de 1,8 milhões de pessoas morram todos os anos (principalmente crianças), associadas a diarreias provocadas pelo consumo de alimentos contaminados e água imprópria para consumo humano, sendo actualmente uma das principais causas de doença e morte nos países em desenvolvimento (Veiga et al., 2009).

Negligência nas regras básicas de preparação dos alimentos estão relacionadas com o aparecimento de surtos de intoxicação alimentar, sendo que os mais comuns são: servir/consumir alimentos crus contaminados, aquecimento dos alimentos de forma imprópria, aquisição de alimentos não controlados, refrigeração inadequada de alimentos e deficientes práticas de higienização dos manipuladores ou de manipulação dos alimentos (WHO, 1999).

### 2.1. Incidência de doenças de origem alimentar na Europa

Na Europa a *European Food Safety Authority* (EFSA) e o *Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) são as entidades responsáveis por compilar e analisar as informações sobre a ocorrência de surtos de DOA (e também zoonoses), provenientes de 27 países da União Europeia, com o objetivo de prevenir a incidência de toxinfecções alimentares, identificar os géneros alimentícios envolvidos, assim como os fatores de contaminação associados à preparação e manipulação dos alimentos (Correia et al., 2013; EFSA, 2014). A EFSA surgiu em 2002, como consequência de uma série de crises ocorridas nos finais da década de 90, tendo como objectivo: restaurar a confiança dos consumidores (nos alimentos consumidos) da União Europeia e garantir um elevado padrão de proteção à saúde dos consumidores na União Europeia. Actualmente a EFSA é a pedra basilar na avaliação de riscos na cadeia alimentar, através da colaboração com as autoridades nacionais. O último relatório disponível da EFSA, referente ao ano 2012, menciona que na União Europeia, foram reportados um total de 5.363 surtos de DOA

provenientes de 25 Estados Membros, o que representa uma diminuição de 5,0%, quando comparados com os registados no ano de 2011 (5.648 surtos). Desses 5.363 surtos, foram notificados 55.453 casos de doença, 5.118 hospitalizações e 41 mortes. Comparativamente com 2011, todos esses valores apresentaram uma diminuição (EFSA, 2013; EFSA, 2014).

Das 41 mortes (cerca de metade de 2011), 12 foram associadas às toxinas produzidas por *Clostridium perfringens*, 10 foram associadas a *Salmonella*, três às toxinas produzidas pelo *Bacillus cereus*, outras três por Norovírus, nove associadas a outros agentes bacterianos (*Listeria monocytogenes*), uma devido a enterotoxinas estafilocócicas, outra por micotoxinas, uma associada a outro agente não especificado e uma por agente desconhecido (EFSA, 2013; EFSA, 2014).

Dentro dos Estados Membros, o número de surtos em que o agente causal não foi conhecido diminuiu de 2.023 em 2011 para 1.478 em 2012, representando um decréscimo de 26,9%. Em 2012, dos surtos em que foi possível identificar o agente causal, os principais responsáveis foram: *Salmonella* (28,6%), toxinas bacterianas (14,5%), vírus (14%) e *Campylobacter* (9,3%) (EFSA, 2013; EFSA, 2014).

Após um declínio no período de 2008 a 2011 no número de surtos causadas por *Salmonella*, em 2012 aumentou ligeiramente (32 surtos), permanecendo contudo, como o agente causal mais frequente (EFSA, 2014). À semelhança do que aconteceu com a *Salmonella*, também o número de surtos causado por toxinas bacterianas aumentou em 2012 ligeiramente (EFSA, 2014). Os vírus subiram uma posição como agente mais frequentemente associado aos surtos relatados, verificando-se um aumento do número de surto de 44,3% em relação ao ano anterior. A maioria destes surtos foi reportada a partir de um único país (Letónia) (EFSA, 2013; EFSA 2014). Dos 101 casos de surtos associados a vírus e que apresentaram forte evidência, 97 foram associados ao vírus Norwalk, três ao da Hepatite A e um a Flavivírus (EFSA, 2013).

O número de surtos causados por *Campylobacter* diminuiu de 2.023 (em 2011) para 1.478 (em 2012), continuando a ser o principal agente causador de surtos associados à carne de frango (EFSA, 2013; EFSA, 2014). Os surtos causados por estirpes de *E. coli* patogénicas também diminuiu em 2012 (EFSA 2014).

Desde o relatório referente ao ano de 2011, os surtos de DOA passaram a ser classificados em duas categorias: surto com forte evidência (quando existe evidências robustas na implicação do facto) e surto de evidência fraca (quando não existe evidências ou as que existem não são robustas) (EFSA, 2013).

Os alimentos que foram implicados com maior número de surtos com forte evidência foram os ovos e os ovoprodutos (22,0%), seguidos de refeições mistas (15,6%) e peixes e seus derivados (9,2%). Valores muito semelhantes aos obtidos em 2011 (EFSA, 2013; EFSA, 2014).

Como nos anos anteriores, a maioria dos surtos implicados em ovos e ovoprodutos foram causados pelo agente *Salmonella* Enteritidis (66,7%) seguido de outras serogrupos de *Salmonella* spp. (20,2%). As refeições mistas tiveram como agente mais frequentemente detetado Calicivírus (26,9%), *Salmonella* (21,0%) e *C. perfringens* (20,2%). Já o agente que mais vezes foi encontrado em surtos associados a peixes e derivados foi a histamina (48,6%, valor significativamente mais baixo do que o obtido para 2011) (EFSA, 2013; EFSA, 2014).

A categoria de alimentos crustáceos, marisco e moluscos foram responsáveis por 4,6% do total de surtos e o agente que mais contribuiu para esses surtos foi Calicivírus (EFSA, 2014).

O local associado a um maior número de surtos foi casas particulares, responsável por 39,7% dos surtos, seguidos dos Restaurante/Café/Bar/Hotel (23,9%, diminuindo de 34,4% em 2011) e de local não identificado (9,6%) (EFSA, 2013; EFSA, 2014).

#### 2.1.1. Doenças de origem alimentar veiculadas pela água

Ao nível dos surtos veiculados pela água, apesar de serem uma pequena percentagem relativamente aos que são anualmente reportados à EFSA, é de ressaltar que este tipo de transmissão apresenta um potencial de afetar um número elevado de pessoas, especialmente se a contaminação ocorrer num abastecimento público (EFSA, 2014).

Em 2012, o número de surtos veiculados pela água com forte evidência aumentou comparativamente a 2011. A maioria dos surtos ficou associada a água de abastecimento privado ou abastecimento proveniente de poço. Em 2012 foram reportados 16 surtos provenientes da água e com forte evidência, envolvendo 1.114 casos de doença, dos quais oito necessitaram de ser hospitalizados, mas sem ocorrência de óbitos. Os agentes foram Calicivírus (três), *E. coli* produtora de verotoxinas (VTEC) (10), *Cryptosporidium parvum* (um) e Rotavírus (um). Houve um surto em que o agente causador não foi identificado.

Todos os 10 surtos em que *E. coli* foi o agente responsável (oito referentes a O157 e dois a O26) foram notificados pela Irlanda, sendo que oito foram detetados em lares para idosos, dos quais sete, após investigação, foram associados a abastecimentos

ligados a fontes ou a poços particulares. Falhas no tratamento da água foi identificado como o fator associado a outros surtos (EFSA, 2014).

O maior surto ocorreu na Grécia e afetou 552 pessoas, das quais duas necessitaram de ser hospitalizadas. O surto de gastroenterites foi notificado num bairro na Grécia com 37.264 habitantes, onde o consumo de água foi considerado como fator de risco para aquisição da infecção. A investigação realizada mostrou baixa incidência de gastroenterites nas áreas adjacentes e com diferentes sistemas de abastecimento de água, que associados aos dados sobre a qualidade da água levantaram a hipótese de um surto veiculado através da água. A hipótese ganhou força com a detecção de Rotavírus em amostras de fezes de pacientes, associado a detecção de indicadores bacterianos de contaminação fecal recente em amostras de água e de cubos de gelo produzidos localmente (EFSA, 2014).

No relatório referente ao ano de 2011, o número de surtos registados foi de apenas 11, contudo provocou 20.167 casos de doença, dos quais 60 foram hospitalizados, não havendo óbitos. Os 11 surtos foram registados por quatro estados membros e foram detetados apenas quatro diferentes patogénicos: *Campylobacter jejuni*, Calicivírus, *E. coli* (VTEC) e *Cryptosporidium hominis*. Ocorreu ainda um surto em que o agente causal não foi conhecido (EFSA, 2013).

Só o surto associado a *Cryptosporidium* (relatado pela Suécia) foi responsável por 20.000 casos de doença. Todos estes casos apresentaram evidência forte de que a contaminação tinha ocorrido através da água (EFSA, 2013).

No geral, os surtos ficaram sobretudo a dever-se a falhas no sistema de tratamento ou a contaminação de águas provenientes de poços e furos. Há no entanto a considerar ainda um caso associado ao sistema de distribuição de água e um em que um alimento não processado contaminou a fonte de água durante a realização de um evento temporário (Festival) (EFSA, 2013).

## 2.2. Incidência de doenças de origem alimentar em Portugal

Em Portugal, existem várias entidades com competência na área da segurança alimentar e saúde pública, sendo o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), a única entidade que reporta esses dados internacionalmente.

A nível nacional, os dados estatísticos foram divulgados pelos 7º e 8º Relatórios do WHO, *Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe* que contemplam o período de 1993 a 2000, sendo que os dados publicados

são apenas referentes a surtos e casos investigados pelo INSA (WHO, 2000; WHO, 2003). No período de 2001 a 2003, pensa-se que não existam dados, uma vez que não foi encontrada tal informação aquando da pesquisa bibliográfica.

A partir do ano de 2004, todos os casos de surtos de DOA que o INSA teve conhecimento estão a ser reportados para a EFSA e disponibilizados através dos relatórios anuais publicados por esta instituição. Atualmente a única entidade que reporta a entidades internacionais (EFSA) os dados de toxinfecções alimentares em Portugal é o INSA. Contudo os dados enviados apenas contemplam os casos detetados por essa instituição, sendo os valores apresentados apenas uma parte da realidade portuguesa (Correia et al., 2013).

Na Tabela 1 pode observar-se o número de surtos e de casos humanos intervenientes nos últimos 6 anos. O número total de surtos neste período foi de 54 e em termos de óbitos, durante esse período apenas se verificou um que teve como agente causal *Yersinia enterocolitica* (Correia et al., 2013; Viegas et al., 2014).

No ano passado o INSA realizou investigação laboratorial de 19 surtos. Em 10 destes surtos foi possível identificar o agente etiológico, tendo sido reportados 183 casos humanos e 17 hospitalizações. Dos nove surtos em que não foi possível identificar o agente etiológico, resultaram 106 casos de doença e oito hospitalizações (Viegas et al., 2014).

Tabela 1 - Surtos com agente etiológico identificado de 2008 a 2013  
(adaptado de Correia et al., 2013 e Viegas et al., 2014)

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total
Surtos	14	11	4	8	7	10	54
Casos	139	251	56	101	135	183	865
Hospitalizados	92	90	0	1	1	17	201
Óbitos	0	1	0	0	0	0	1

O tipo de produto onde foi possível identificar com maior frequência o agente etiológico foram as refeições mistas e os produtos de pastelaria. Continuam a existir cerca de 20% dos casos em que não é possível categorizar o género alimentício associado à toxinfecção alimentar. Em 2013, 77% dos surtos onde se detetou o agente etiológico, foram provenientes de refeições mistas (Viegas et al., 2014). E os locais onde ocorrem a exposição do alimento implicado nos surtos são predominantemente as cantinas e as casas particulares (Viegas et al., 2014).

Os principais agentes etiológicos associados aos casos de surtos de origem alimentar durante os anos 2008 a 2013 foram: *Salmonella* spp, toxinas de *Staphylococcus aureus* e *B. cereus* (Correia et al., 2013; Viegas et al., 2014).

A agente causal mais frequente associado aos surtos de 2013 foi a enterotoxina estafilocócica (cinco). *C. botulinum*, *C. perfringens*, *E. coli* (VTEC) foram associados a um caso cada e Norovírus GII a dois surtos (Viegas et al., 2014).

No que se refere ao ano de 2012, os agentes associados aos sete surtos (todos com forte evidência) foram: toxinas produzidas por *Clostridium* (quatro, das quais dois, referentes a *C. botulinum*), toxinas por Estafilococos (dois) e *E. coli* (um) (EFSA, 2014).

Ao nível de DOA veiculadas pela água não foi encontrada nenhuma informação disponível e talvez esses dados não existam. Contudo convêm não esquecer que a água intervém em qualquer fase na cadeia alimentar, quer através da sua ingestão, quer como meio de lavagem de outros alimentos e utensílios, daí que a qualidade da água seja um pré-requisito para a segurança alimentar pelo que não deve ser descurada como veículo de DOA (CAC, 2003; Regulamento 852, 2004).

### **3. O Gelo**

Denomina-se por gelo a água no estado sólido. A passagem do estado líquido para o sólido, normalmente designado por ponto de fusão, ocorre aos 0 °C para a pressão de uma atmosfera (Mendes & Oliveira, 2004).

#### **3.1. Matéria Prima, a água**

A água é indispensável a todas as formas de vida, sem ela, a vida tal e qual como é conhecida, não existiria. O Homem muito dificilmente sobreviveria uma semana sem a ingestão de água (Mendes & Oliveira, 2004).

Como alimento, a água é um elemento vital à vida, fazendo parte de uma das sete classes de nutrientes necessários à alimentação humana, sendo aquele que é necessário em maior quantidade. A água representa cerca de 60 a 65% do peso corporal do Homem, sendo recomendado a ingestão diária de 1,5 a 3 L. (Instituto do Consumidor, 2004; Direção Geral de Saúde (DGS), 2005).

A água encontra-se no centro da roda dos alimentos. É um elemento presente na constituição de quase todos os alimentos, não fazendo parte de um grupo próprio que

constitui a Roda, pois está representado em cada um dos sete grupos que a constituem (embora em proporções diferentes) (Instituto do Consumidor, 2004; DGS, 2005).

Além do abastecimento em quantidade suficiente, é requisito essencial que a água seja inócua do ponto de vista da saúde pública, uma vez que é, também, um dos principais veículos responsáveis pela transmissão de doenças (Mendes & Oliveira, 2004).

### 3.2. O gelo como alimento

O gelo é um dos estados físicos da água, contudo a nível alimentar o gelo é mais do que água no estado sólido usado como agente de arrefecimento (Castro et al., 2013).

Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que cada americano compre cerca de quatro sacos de gelo embalado por ano, sendo que grande parte destes são adquiridos durante o verão (Mako, Harrison, Sharma & Kong, 2014).

O gelo apresenta várias utilizações que remontam ao século passado, quando as pessoas o usavam com a finalidade de preservar e conservar os alimentos. Na sociedade actual, o gelo é frequentemente consumido por si só, misturado em bebidas (para as refrescar), usado para conservar alimentos, em especial, peixe e marisco ou para outros fins culinários (Gerokomou et al., 2011; Mako et al., 2014). Deste modo, este alimento pode ser ingerido de forma direta, quando consumido por si só ou adicionado a bebidas e alimentos e de forma indirecta, quando utilizado para preservar alimentos (Gerokomou et al., 2011).

Devido a facto de ser o nutriente que o Homem carece em maiores quantidades, compreende-se a elevada relevância que este produto (no estado líquido/sólido) tem no enquadramento das toxinfecções alimentares (Instituto do Consumidor, 2004; Castro et al. 2013).

Se a água utilizada para a produção do gelo se encontrar contaminada com microrganismos patogénicos, o processo de congelação não consegue destruí-los e muitos deles podem sobreviver no gelo e recuperar a sua viabilidade quando o gelo derrete. Embora o seu número vá reduzindo gradualmente com o tempo de congelação e muitos possam encontrar-se stressados e em condições de viabilidade reduzida, a verdade é que tendem a recuperar a viabilidade normal quando o gelo descongela (Lateef, Oloke, Kana & Pacheco, 2006; Castro et al., 2013; Mako et al., 2014).

Kim & Harrison (2008), demonstraram que *E. coli* O157:H7 foi transferida do gelo derretido (produzido a partir de água contaminada com esta estirpe) para a alface, concluindo que o gelo pode ser um caminho possível de contaminação para alimentos e

bebidas. Confirma-se assim que o gelo é um veículo ideal para a transmissão de bactérias e vírus patogénicos para alimentos e bebidas.

Outra fonte genérica de contaminação é o estado em que este género alimentício é manipulado, tendo em consideração os equipamentos usados para produção/manutenção assim como as regras de higiene e as práticas dos manipuladores de alimentos (Food Safety Authority of Ireland (FSAI), 2007).

Moore, Brown & Hall (1953) alertaram para o problema de saúde pública associado à qualidade sanitária do gelo picado usado para refrigerar bebidas e outros alimentos em serviços de restauração. Segundo estes autores, o gelo deve apresentar os mesmos padrões bacteriológicos de qualidade que a água para consumo humano. Contudo qualquer pessoa que tenha assistido à transferência de gelo para os copos com bebidas sabe o quão frequente é os dedos tocarem no gelo, utilizando ou não, um utensílio específico para o efeito. Este ato é exemplo de um meio para a transmissão de microrganismos patogénicos.

Bactérias como *E. coli*, *Salmonella* e *Shigella* podem sobreviver aos processos de congelação e descongelação, mesmo em condições de alto teor alcoólico, elevada acidez e na presença de gás, tais como o carbonato de sódio, aumentando o risco microbiológico associado ao gelo (Mako et al., 2014). A taxa de sobrevivência das bactérias para estas circunstâncias, depende da/o: tipo e estirpe do microrganismo, concentração microbiana, estado nutricional (fase e taxa de crescimento) e tempo/temperatura de congelação (Lateef et al., 2006; Mako et al., 2014). A carga microbiana poderá ainda ser influenciada por parâmetros físicos e químicos tais como: pH, turvação, condutividade, alcalinidade e nitratos (Mako et al., 2014).

Em suma, o gelo quando em contato direto com outro alimento de temperatura mais elevada, irá fundir-se, transferindo todo o seu conteúdo para os alimentos e bebidas com os quais esteja em contato, potencializando-se num veículo de infeções para o consumidor, originando toxinfecções alimentares. O risco associado a este processo é elevado uma vez que na maioria dos casos este produto não irá sofrer nenhum tratamento que elimine a sua carga microbiana (Lateef et al., 2006; Gerokomou et al., 2011).

### 3.3 Fabrico/Produção do gelo

O gelo pode ser utilizado como alimento para consumo humano e, como qualquer outro alimento, tem o potencial para causar DOA, se não for fabricado e manuseado em

condições de higiene. Todos os que estão envolvidos no manuseamento, serviço ou fabrico de gelo que será consumido ou que entre em contacto com os alimentos, tem a responsabilidade de garantir que o gelo é seguro, próprio para consumo e livre de microrganismos nocivos (Queensland Health, 2013).

O gelo para consumo humano pode ser produzido em grande escala a nível industrial e em estabelecimentos de restauração e bebidas para consumo direto dos seus próprios clientes. No caso da produção industrial esta é realizada em máquinas próprias para o efeito e produzindo grandes quantidades. Em contrapartida a produção para venda direta aos clientes é feita em máquinas próprias para o efeito mas de reduzida escala, em sacos próprios de congelação ou em cuvetes.

Segundo Mendes (2009), as máquinas de produção de gelo possuem características intrínsecas, que associadas com o modo de funcionamento podem conter diversos tipos de géneros microbianos, tais como: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavomonas*, *Staphylococcus* e ainda leveduras. Ao longo dos tempos as próprias máquinas tem sofrido alterações/desenvolvimentos no que concerne ao modo de fabrico e funcionamento tendo como objetivo garantir a qualidade do produto produzido, exemplo disso é o facto de nas máquinas atuais, ao contrário do que aconteceu no passado, o fornecimento de água ser efetuado através de uma ligação direta à rede predial de fornecimento de água ao invés, desse fornecimento ser manual.

Várias entidades publicaram códigos de Boas Práticas de Fabrico (BPF) para a produção de gelo, entre elas a *Association of Food and Drug Officials* (AFDO). Esses códigos afirmam que os fabricantes devem produzir, armazenar e transportar o gelo em condições de higiene aceitáveis, manter os equipamentos limpos e higienizados, monitorizar o estado de higiene e saúde dos empregados e utilizar água proveniente de uma fonte confiável. Nos EUA, as empresas de produção de gelo, são obrigadas a seguir as BPF básicas, contudo são aplicadas de forma diferente de Estado para Estado (Mako et al., 2014).

A IPIA (*Internacional Packaged Ice Association*), citada por Mako et al., 2014, publicou um manual sobre esse assunto, contudo é feito especificamente para o gelo comercial. Esta associação exige o desenvolvimento e implementação de um sistema de HACCP, para adesão das empresas a esta organização, contudo tal requisito não é exigido pela FDA (*Food and Drug Administration*).

Na Europa, o Regulamento n.º 852 de 2004 obriga a que todo o gelo que contacte com alimentos ou que possa contaminar outros géneros alimentícios seja fabricado a partir de

água potável. Todos os procedimentos associados à produção, manuseamento e armazenamento devem ser realizados em condições de o proteger de qualquer contaminação.

Segundo as autoridades na área da segurança alimentar de Queensland (Austrália), os operadores do setor alimentar devem estar cientes de que o gelo é vulnerável à contaminação, nesse sentido criou uma base de recomendações específicas sobre a produção e manuseamento do gelo. Essas recomendações apresentam pontos muito generalistas que se adequam à maior parte dos cuidados de higiene a ter aquando da manipulação de alimentos, contudo destacam-se os seguintes pontos:

1. O gelo deve ser higienicamente armazenado, manipulado e apresentado (não quebrar ou deixar o saco de gelo no chão ou outras superfícies sujas; não tocar nas zonas da colher/pá/pinça que entram em contato com o gelo; desprezar o gelo que foi retirado do local de conservação e não foi utilizado);
2. Manuseado/dispensado utilizando utensílios limpos (com um periodicidade definida de pelo menos diária e conservado em local que impeça a sua contaminação), ou manipulado usando luvas;
3. Caso use máquina de gelo, esta deve ser limpa, inspecionada (incluindo-a no cronograma de limpeza), a porta da máquina deve ser mantida fechada e a sua localização deve ser no interior das instalações (Queensland Health, 2013).

Ao nível do gelo produzido comercialmente deve-se ainda ter atenção as condições de higiene associados ao processo de embalamento, assim como da qualidade dos sacos. Deve ser rotulado com identificação do lote do fabricante (código do lote), para que possa ser identificado e rastreado de modo a que, por exemplo, se possa recolher todo um lote de produto, caso exista essa necessidade (Queensland Health, 2013).

Estas recomendações são na sua generalidade iguais às referidas no trabalho de Mendes (2009) e que resultaram na compilação de pareceres de vários autores. Destaca-se adicionalmente o facto de sugerirem a ligação direta da máquina à rede de saneamento, sendo recomendado a existência de válvula de retorno.

Em suma, devem ser tomadas medidas para que o gelo usado para fins alimentares, seja produzido a partir de água com qualidade para consumo humano e o gelo deve ser produzido, manuseado e armazenado de forma a evitar, prevenir e proteger eventuais contaminações (Regulamento 852, 2004).

### 3.4. Qualidade do gelo - requisitos microbiológicos

O gelo é um produto alimentar que tem como única matéria-prima a água. Qualquer pessoa que fornece gelo para consumo tem a obrigação de garantir que este é seguro e que a qualidade é aceitável (Queensland Health, 2013).

A WHO (2011a) declarou que o gelo para ser consumido ou entrar em contato com alimentos que irão ser consumidos deve apresentar um nível de qualidade e de segurança idêntico à água para consumo humano, devendo seguir-se as linhas orientadoras emitidas por esta Organização sobre a qualidade da água para consumo humano.

De acordo com a Legislação europeia, o gelo para ser consumido pelos seres humanos, deve ser preparado a partir água potável, mas em muitas situações, devido à uma deficiente qualidade da água e/ou devido a práticas incorretas de manipulação e transporte, torna-se um veículo de microrganismos patogénicos causando surtos de DOA (Regulamento 852, 2004; Gerokomou et al., 2011).

Vários autores referem que o gelo para consumo humano para ser seguro deve apresentar a mesma qualidade do que a água usada para consumo humano, uma vez que o gelo será ingerido ou entrará em contacto com alimentos (Lateef, et al., 2006; Ferreira, Lopes, Pereira, Rodrigues & Costa, 2014).

Assim sendo os critérios microbiológicos para a água de consumo humano, semelhantes ao que é recomendado pela WHO, são geralmente aplicados ao gelo. Isto acontece porque muitos países não têm diretrizes e referenciais nacionais específicos para o gelo (Lateef et al., 2006).

A IPIA elaborou orientações para a indústria com o objetivo de assegurar a qualidade microbiológica do gelo embalado. Segundo essas orientações o gelo embalado deve ser ausente de Bactérias Coliformes e a carga microbiana total (35 °C durante 48 h), deverá ser inferior a 500 ufc mL<sup>-1</sup>. Tais valores foram criticados por serem irrealistas para todos os tipos de processamento de gelo, especialmente para o gelo produzido internamente pelos estabelecimentos de restauração e bebidas, que tenha sido submetido a processos de manipulação. Tem sido sugerido que a carga microbiana total do gelo não produzido comercialmente deva ser inferior a 1x10<sup>3</sup> ufc mL<sup>-1</sup> (Lateef et al., 2006).

Como um alimento fabricado, a produção de gelo é coberto pelas normas de BPF, que contemplam os requisitos das instalações onde é fabricado, a qualidade de fonte de água e práticas sanitárias durante a sua produção. Também deve haver realização de testes

analíticos e estabelecimento do sistema HACCP para garantir a segurança microbiológica de gelo (Lateef et al., 2006).

A qualidade da água produzida para consumo humano em Portugal é definida pelo Decreto-Lei (DL) n.º 306/2007, de 27 de agosto. Em Portugal as empresas de produção de gelo, na maioria dos casos, utilizam esse mesmo DL para verificar a qualidade do seu produto, associado a boas práticas de higiene ao longo do processo de produção e armazenamento (Gelo expresso, s.d.).

Na restauração coletiva a produção/utilização de gelo na maioria dos casos nem sempre é controlada ao nível dos planos do sistema HACCP ou BPF. O risco para os consumidores aumenta devido ao facto de este produto ser manipulado, muitas vezes com deficientes práticas de higienização, não sofrendo posteriormente nenhum tratamento, de forma a reduzir/eliminar a carga microbiana.

Na Tabela 2 estão apresentados os parâmetros microbiológicos requeridos, assim como os respetivos valores de referência relativos à qualidade do gelo e/ou água para Consumo Humano.

Tabela 2 - Resumo dos parâmetros e respetivos valores paramétricos associados à qualidade microbiológica do gelo e/ou água para consumo humano

Fonte	Âmbito	BC (ufc 100 mL <sup>-1</sup> )	<i>E. coli</i> (ufc 100 mL <sup>-1</sup> )	CM (ufc mL <sup>-1</sup> )
<i>Food and Environmental Hygiene Department</i> (FEHD), 2005	Gelo embalado	0	0	<500
	Produzido em estabelecimentos de alimentação	<100	0	< 1x10 <sup>3</sup>
IPIA, 1989 <sup>#</sup>	Gelo Comercial	0		<500
WHO, 2011 <sup>a</sup>	Água para Consumo Humano	0	0 <sup>1</sup>	Não específica
DL n.º 306/2007, Portugal	Água para Consumo Humano	0	0 <sup>2</sup>	100 a 22 °C* 20 a 36 °C*
FSAI, 2007	Gelo	0	0 <sup>3</sup>	
Portaria 2.914/2011 (Brasil)	Água para Consumo Humano	0	0 <sup>4</sup>	<500*

<sup>1</sup> Recomendado a pesquisa de *C. perfringens*; <sup>2</sup> Não deve apresentar também Enterococos Intestinais e *C. perfringens* por 100 mL; <sup>3</sup> Não deve apresentar também Enterococos Intestinais por 100 mL; <sup>4</sup> Ausente em 95% das amostras analisadas num mês; \*Recomendação #Citado por Lateef et al. (2006); BC-Bactérias Coliformes; CM – Carga microbiana a 35 °C /48 h.

### 3.5. Estado da arte - estudos sobre a qualidade do gelo

Ao longo dos anos, vários estudos sobre a qualidade do gelo usado diretamente para consumo humano ou com interveniência nos processos de produção de géneros alimentícios tem sido realizados no sentido de verificar a qualidade apresentada por este produto.

A importância da qualidade do gelo para consumo humano ao nível microbiológico tem sido destacada por pesquisas realizadas por diversas entidades de vários países (Queensland Health, 2013).

Diversos são os casos em que o gelo se encontra num estado visual de higiene satisfatório contudo, muitas vezes os resultados analíticos não demonstram isso, sendo a situação preocupante devido às muitas oportunidades de contaminação (Gerokomou et al., 2011).

Na década de 50 do século passado, Moore et al. (1953) foram dos primeiros a relatar a presença de coliformes, assim como teores elevados de microrganismos no gelo picado e servido para refrigerar bebidas em estabelecimentos de restauração associado a Universidades dos EUA. A origem desses microrganismos provinha de práticas incorrectas de manuseamento.

A Unidade de Saúde Pública de Queensland, realizou em 2001 um estudo sobre a qualidade do gelo usado em Hotéis, Restaurantes e Bares verificando que 26,6% dessas amostras não cumpriam com os critérios desse país para água de consumo humano. O gelo amostrado era de diferentes fontes (comercial e produzido internamente) e a investigação associada a este estudo verificou práticas incorretas de manuseamento de gelo que podem ter levado à sua contaminação (Queensland Health, 2013).

Em Hong Kong, um estudo realizado sobre a qualidade do gelo produzido e embalado industrialmente, revelou resultados satisfatórios nas 12 amostras estudadas, contudo as 89 amostras de gelo colhidas em diversos estabelecimentos (principalmente do setor alimentar) apresentaram concentrações elevadas em Bactérias Coliformes (9% das amostras com resultados superiores a 100 ufc 100 mL<sup>-1</sup>) e microrganismos cultiváveis (MC) (3% com valores superiores a 1x10<sup>3</sup> ufc mL<sup>-1</sup>) (FEHD, 2005).

Na Nigéria, mais especificamente em Ogbomoso, Lateef et al. (2006), levaram a cabo um estudo tendo como finalidade caracterizar microbiologicamente o gelo comercial usado para refrigerar bebidas e conservar peixe. Os valores de referência para microrganismos a 37 °C utilizados foram de 500 ufc mL<sup>-1</sup> para gelo produzido comercialmente e 1x10<sup>3</sup> ufc mL<sup>-1</sup> para gelo produzido internamente nos

estabelecimentos de restauração e bebida. As amostras colhidas neste estudo apresentaram uma carga microbiana que variou entre 1,88 a  $3,29 \times 10^4$  ufc mL<sup>-1</sup> e ausência de Bactérias Coliformes. Os resultados obtidos em termo de carga microbiana foram largamente superiores ao recomendado. Isolamentos microbianos realizados adicionalmente, demonstraram uma grande variedade de espécies (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, e entre outros) que na sua maioria são patogênicas para o Homem. Estudos adicionais de resistência a antibióticos foram também efetuados às estirpes isoladas e apresentaram uma resistência para os antibióticos entre 50 e 87,5%, com resistência múltipla para quatro a sete antibióticos. Este tipo de contaminação resulta provavelmente da contaminação ao nível da matéria-prima, já que a água usada para a produção era proveniente de furos e na maioria das cidades da Nigéria não existe sistema de tratamentos de águas residuais, pelo que os efluentes deste tipo vão diretamente para o solo (através de fossas), infiltrando-se pelo solo e poluindo a água subterrânea.

Em 2009, Gerokomou et al. (2011) realizaram um estudo sobre a qualidade física, química e microbiológica do gelo comercial usado para conservar o peixe e marisco, assim como para refrescar bebidas na zona de Épiro. Foi detetado em 31% das amostras a presença de coliformes totais e 22% continham *E. coli*. As amostras em que foram detetados coliformes não cumpriam os critérios microbiológicos previstos na legislação Grega sobre a qualidade da água. A pesquisa de outros microrganismos patogênicos demonstrou a presença de *C. perfringens* (51%), *P. aeruginosa* (3%), *Salmonella* spp. (4%) e *Yersinia* spp. (2%) nas amostras recolhidas.

A presença de *E. coli* é indicadora de uma contaminação fecal recente, sendo a teoria de contaminação oral-fecal reforçada. A presença de Bactérias Coliformes e de *C. perfringens* podem ser também indicativos de contaminação ambiental. A inexistência de registos sobre a frequência de desinfecção e limpeza das máquinas produtoras de gelo indica que tal prática deverá ocorrer com pouca frequência (Gerokomou et al., 2011).

No estudo intitulado “Qualidade microbiológico do gelo em cubos comercializado em São Luis”, Castro et al. (2013), mediante a amostragem de gelo em cubo proveniente de cinco marcas diferentes, verificaram que apenas 40% das amostras estudadas apresentavam Bactérias Coliformes e parte destas eram coliformes fecais. Apenas uma das cinco marcas testadas, apresentou conformidade para o parâmetro bactérias coliformes para todas as suas amostras de acordo com a legislação em vigor no Brasil para águas destinada a consumo humano. Todas as amostras apresentaram contagens de

mesófilos relativamente altos, valores que são indicadores de deficientes condições higiénicas aquando do processo de fabrico do gelo.

Ferreira et al. (2014), mostraram que o gelo utilizado na região de Raposa, Brasil, na conservação do peixe serra se apresentava contaminado por bactérias coliformes (75%), assim como por *E. coli* (25%). Os resultados acima apresentados estão coerentes com outros estudos desenvolvidos no Brasil e já referidos neste trabalho.

No estudo desenvolvido por Giampietro & Rezende-Lago (2009), citado por Ferreira et al. (2014), em quatro estabelecimentos comerciais da zona do Ribeirão Preto concluiu que 96,7% das amostras apresentavam bactérias coliformes e 73,3% *E. coli*.

Numa outra investigação sobre a qualidade do gelo comercial, proveniente de indústrias localizadas da cidade de Teresina, todas as amostras colhidas apresentavam contaminação por bactérias coliformes e *E. coli* (Ferreira et al., 2014).

Num estudo realizado por Mako et al., 2014 em que compararam a qualidade do gelo produzido em fábricas à escala industrial, com o gelo comercial mas vendido em lojas e produzido por máquinas internamente em lojas de restauração, verificou-se que todas as amostras de gelo comercial obtiveram resultados satisfatórios de acordo com a IPIA. As amostras de gelo embalado mas vendido em lojas de retalho, assim como produzido por máquinas de venda automática apresentaram uma percentagem considerável com valores de carga microbiana total acima do aceitável ( $500 \text{ ufc mL}^{-1}$  a  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48h), assim como de Bactérias Coliformes, Enterococos Intestinais e uma das amostras revelou-se positiva para *Salmonella* e outra para *Enterobacter agglomerans*.

Esses estudos evidenciam que a qualidade do produto testado é preocupante devido à presença de bactérias coliformes, *E. coli* e uma grande variedade de microrganismos patogénicos, podendo o gelo, ser considerado como um veículo de diferentes patogénicos humanos.

A qualidade insatisfatória do gelo estabelece uma série ameaça para os consumidores deste produto ou de produtos que estiveram em contacto com este e não sofreram nenhum tipo de tratamento posterior capaz de eliminar microrganismos. Este perigo aumenta em especial nas zonas com clima quente ou temperado e em vendas ambulantes (Gerokomou et al., 2011).

O gelo pode também representar uma nova rota de disseminação de bactérias resistente aos antibióticos especialmente em países em desenvolvimento (Lateef et al., 2006). Na sua generalidade os resultados indicam que a contaminação ocorreu ao nível da matéria-prima ou resultante de deficientes condições higiénicas. A presença de Bactérias

Coliformes em especial *E. coli* indica que a água utilizada na produção de gelo, possivelmente teve contato direto ou indireto com contaminação de origem fecal, proveniente da deficiente qualidade da matéria-prima utilizada ou por falhas durante o processo de produção do gelo, tais como: escassez/falta de hábitos de higiene dos manipuladores, contaminação cruzada por utensílios e equipamentos ou ineficaz limpeza e higienização dos equipamentos e materiais utilizados (Lateef et al., 2006; Gerokomou et al., 2011). Dos pontos acima referidos destacam-se a falta de formação/treino na área de manipulação e higienização em particular das máquinas, pois estas devem ser desmontadas, limpas e desinfetadas pelos manipuladores envolvidos no manuseamento deste género alimentício. Estes manipuladores incluem, o pessoal afeto à produção de gelo comercial, *barmen* (que muitas vezes manipulam o gelo com as mãos), pescadores e vendedores de peixe, entre outros.

A contaminação do gelo por via ambiental também deve ser ponderada. Esta transmissão ocorre principalmente através do ar e dos utensílios usados para manipular o gelo e que se encontram muitas vezes expostos ao ar sem qualquer proteção. O gelo é normalmente armazenado em baldes ou geladeiras, ao lado de alimentos de várias origens, particularmente em bares e Restaurantes ficando suscetível a contaminação ambiental (Gerokomou et al. 2011).

As principais fontes de uma possível contaminação, associada à deficiente qualidade do gelo apresentado nos diversos estudos compilados foram:

- Qualidade da matéria-prima, especialmente em países em desenvolvimento; caso a água seja proveniente de um sistema público de abastecimento a probabilidade de contaminação é reduzida drasticamente, contudo não deve ser totalmente descorada;
- Durante o processo de fabrico (em especial em produção artesanal), podendo resultar de uma contaminação com poeiras e resíduos;
- Contaminação durante o processo de armazenagem e conservação;
- Deficientes condições higiénicas dos equipamentos usados tais como: máquinas de produzir gelo, trituradores, recipientes de acondicionamento do gelo e utensílios de manuseamento;
- Deficientes práticas na manipulação do gelo (Moore et al., 1983; Lateef et al., 2006; Gerokomou et al. 2011).

A maioria dos autores partilham da ideia que é altamente recomendável a criação de diretrizes nacionais/internacionais que regulamentem a produção de gelo (Lateef et al., 2006), que a qualidade do gelo seja considerada um ponto crítico para a saúde dos

consumidores e que as autoridades competentes realizem ações de vigilância (Ferreira et al., 2014; Mako et al., 2014).

### 3.5.1. Surtos de doenças associados à qualidade do gelo

As infeções microbianas adquiridas através do gelo contaminado, não são raras e têm sido relatados surtos, tendo como veículo de contaminação o gelo, em várias partes do mundo (Lateef et al., 2006). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (2000) tem relatado surtos de DOA, onde o veículo de contaminação foi o gelo. O número real poderá ser muito superior uma vez que mais de 50.000 casos por ano de doenças transmitidas por alimentos tem origem desconhecida, mas o gelo não é um dos primeiros produtos alimentares a ser investigado, mesmo tratando-se de situações em estabelecimentos de grande volume de venda e consumo de gelo.

Os microrganismos associados a estes surtos foram: *E. coli* O157:H7, *Legionella pneumophila*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Giardia lamblia*, *P. aeruginosa*, *Mycobacterium fortuitum e gordonae*, *Enterobacter cloacae*, *Stenotrophomonas gordonae* e vírus do género *Norovirus* (Norwalk-like) e da hepatite A (Laussucq et al., 1988; FEHD, 2005; Lateef et al., 2006; Mendes, 2009; Waturangi et al., 2013).

Em Portugal, segundo os contactos desenvolvidos junto do INSA e da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) não existem registos de surtos associados à deficiente qualidade do gelo alimentar.

Quick et al. citados por Lateef et al. (2006), em 1982, documentaram um surto de gastroenterite associado ao microrganismo *Giardia lamblia* num Restaurante devido ao consumo de gelo contaminada em bebidas. A contaminação deveu-se ao facto do manipulador deste produto ter as mãos contaminadas com o microrganismo em questão e ter servido o gelo utilizando as suas mãos.

A investigação levada a cabo devido ao aparecimento de um *cluster* de surtos de gastroenterite nos Estados da Delaware e da Pensilvânia em setembro de 1987 que afetou 5.000 pessoas, concluiu que o vírus Norwalk foi o responsável pelo surto e que este se encontrava presente no gelo. Houve uma associação considerável entre os hábitos alimentares dos doentes, o microrganismo responsável e o gelo (CDC, 1990).

Para além do gelo produzido e/ou consumido nos serviços de restauração e bebidas, o gelo pode ser produzido, consumido e/ou aplicado também numa vertente hospitalar, nomeadamente, em aplicação local de processos inflamatórios (Laussucq et al., 1988).

A WHO alerta que a qualidade do gelo no meio hospitalar deve ser assegurada e até reforçada, em especial se for utilizado em doentes de riscos. O consumo de gelo (por aspiração) tem sido associado a infeções em pacientes imunocomprometidos ou com deficiências respiratórias significativas (WHO, 2011b).

No ano de 1986, um paciente foi contaminado pela bactéria *Mycobacterium fortuitum* em meio hospitalar. O estudo desenvolvido mostrou a associação ao consumo de gelo produzido na máquina desse Serviço (Laussucq et al., 1988).

Em 2002 nos EUA ocorreu um surto, por Norovirus, devido a um empregado doente, ter manipulado o gelo sem ter lavado as mãos, contaminando o gelo que se encontrava conservado em caixas térmicas. Aproximadamente 80 pessoas ficaram doentes após ingerirem bebidas que continham gelo. Embora a morte resultante de Norovirus seja rara, um menino de 15 anos saudável morreu quando se engasgou com o seu próprio vômito. Um processo de morte por negligência resultou em um acordo de 3 milhões de dólares (Queensland Health, 2013).

Parshionikar *et al.* (2003), descreveram um surto de Calicivírus humano associado a gelo para consumo devido a água de abastecimento ter sido contaminada por água proveniente de um poço.

Na Tailândia, um surto tendo origem em gelo contaminado com vírus da Hepatite A, tendo origem na água usada na produção, afetou cerca de 900 pessoas em maio de 2005 (Lateef et al., 2006).

Num estudo desenvolvido em 2013 em Jacarta, as amostras de gelo apresentaram-se contaminadas por *Vibrio cholerae* (78% classificadas como não pertencentes ao serogrupo O1). A contaminação de gelo por *V. cholerae* deve-se provavelmente ao facto da água usada para a produção deste já se encontrar contaminada com este microrganismo. Esta situação é ainda mais relevante devido ao facto de a cólera ter sido classificada como uma das doenças emergentes, continuando a ser um problema grave de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento agravado pelo consumo de gelo contaminado com bactérias resistentes aos antibióticos (Waturangi et al., 2013).

Em 2013, um Hospital de Pittsburgh anunciou três casos de doença dos legionários (incluindo uma morte), resultante da contaminação por *Legionella* spp. em máquinas de gelo. A presença de *Legionella* spp. no gelo não é geralmente significativa para a transmissão da doença, contudo pode acontecer especialmente em doentes vulneráveis, associados a episódios de aspiração de gelo (Special Pathogens Laboratory, 2014).

Os vários autores, dos estudos referidos anteriormente, reforçam a ideia de que a qualidade do gelo está diretamente associada à qualidade da matéria-prima, boas práticas de manuseamento do gelo, boas práticas de higiene tanto dos manipuladores como dos equipamentos envolvidos e por último à formação dos manipuladores. O modo como são construídas as máquinas e o seu próprio *layout* tem vindo a sofrer alterações no sentido destes itens deixarem de estar ligados diretamente à deficiente qualidade deste produto. Uma dessas evoluções mais significativas foi o abastecimento da máquina com água ter deixado de ser fornecido manualmente e ter passado a ser efetuado automaticamente por ligação à rede de abastecimento.

#### **4. Parâmetros microbiológicos**

A pesquisa de todos os agentes patogénicos na água seria inviável, pelo que foi definida, pelas entidades competentes, uma lista de parâmetros que são indicadores da qualidade da água e que indirectamente fornecem informação sobre a presença de microrganismos potencialmente mais perigosos para a saúde humana.

##### 4.1. Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36 °C

A água, qualquer que seja a sua natureza, contém microrganismos de origens diferentes nomeadamente do solo e da vegetação, cujo número total dá uma informação útil para a avaliação e vigilância da qualidade da água. A pesquisa a temperaturas diferentes permite avaliar as diferentes origens dos microrganismos detetados. A determinação destes parâmetros mostra-se bastante útil no controlo da eficácia dos processos de tratamento, nível de limpeza, higienização e estado de conservação dos equipamentos envolvidos. O principal interesse da contagem de colónias (ou carga microbiana como é vulgarmente designada) está na possibilidade de detetar variações dos resultados numa vigilância frequente e a longo prazo, constituem um primeiro aviso de um foco de contaminação ((*Internacional Standard Organization*) ISO 6222:1999); Roberts & Greenwood, 2003; Ali & Osman, 2012).

##### 4.2. Bactérias Coliformes e *E. coli*

As Bactérias Coliformes são um grupo de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, que tem a capacidade de fermentar a lactose são oxidase positiva, bacilos Gram negativas, aeróbias facultativas e não têm a capacidade de formar esporos. As Bactérias Coliformes incluem vários tipos de bactérias das quais se destacam *E. coli*,

*Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, sendo apenas a primeira exclusivamente presente no trato intestinal do Homem e parte dos animais (Jay, Loessner & Golden, 2005).

A pesquisa de Bactérias Coliformes, é um indicador geral de higiene, visto que inclui bactérias que vivem no solo e em águas superficiais, as quais não são exclusivamente de origem fecal, embora inclua *E. coli*, indicador de origem fecal. Deste modo, a presença de Bactérias Coliformes, embora não sendo prova de contaminação fecal, poderá indicar deficiência no tratamento ou manuseamento. A presença e grau de contaminação fecal são fatores de maior importância na determinação da qualidade dos alimentos e do risco para a saúde. A presença de *E. coli*, microrganismo que normalmente habita o intestino humano e de outros animais de sangue quente, evidencia uma contaminação de origem fecal (ISO 9308-1:2000; Recomendação Instituto Regulador de Águas e Resíduos (IRAR) n.º5, 2005; Jay et al., 2005; Ali & Osman, 2012).

A presença de estirpes de *E. coli* é preocupante, podendo representar um risco de saúde pública, pois, 6 grupos (patotipos) deste tipo de bactérias provocam DOA em seres humanos (*E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* (VTEC) no qual se incluem as estirpes enterohemorrágicas (EHEC) como *E. coli* 0157:H7 (Willshaw, Cheasty & Smith, 2000; *Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF), 2003; Jay et al., 2005; Meng, Doyle, Zhaot, & Zhaot, 2007; Forsythe, 2010; *Public Health England* (PHE), 2014).

#### 4.3. Enterococos Intestinais

Os Enterococos Intestinais são bactérias aeróbias, Gram positivas, normalmente agrupados em cadeia, catalase negativa e com capacidade de se desenvolverem a temperaturas até os 44 °C (ISO 7899-2:2000; Ashbolt, Grabow & Snozzi, 2001).

Os Enterococos Intestinais são por norma considerados como indicadores de poluição fecal, embora um pequeno número destes microrganismos, encontrados na água, provenha também de outros *habitats*. Os Enterococos Intestinais englobam um vasto número de espécies tais como: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, frequentemente encontradas nas fezes humanas e de animais de sangue quente. Outras espécies de *Enterococcus* de origem fecal, mas apenas ocasionalmente encontrados em amostras de água são o *E. avium*, *E. cercorum*, *E. columbae* e *E. gallinarum* e algumas espécies do género *Streptococcus* (nomeadamente *S. bovis* e *S. equinus*) (ISO 7899-

2:2000; Ashbol et al., 2001; Jay et al., 2005; Ali & Osman, 2012). As espécies do género *Streptococcus* tem a particularidade de na água, não conseguirem sobreviver durante muito tempo pelo que a probabilidade de serem detetadas em amostras é muito baixa (ISO 7899-2:2000).

Para fins de avaliação da qualidade da água, os Enterococos Intestinais são considerados como indicadores de contaminação de origem fecal, no entanto deve-se ter em consideração, que algumas estirpes de *Enterococcus* detetadas ocasionalmente pelo método associado a este parâmetro, sejam proveniente de outros *habitats* diferentes dos de origem fecal (*E. casseliflavus* e *E. mundtii*) (ISO 7899-2:2000; Ashbolt et al., 2001).

#### 4.4. *Clostridium perfringens*

*C. perfringens* é uma bactéria pertencente à família *Bacillaceae*, de forma bacilar, Gram positiva, imóvel, anaeróbia estrita e com capacidade de formar esporos, (MacLane, 2007; Environment Agency (EA) – Part 6:2010; ISO 14189:2013).

A pesquisa de *C. perfringens* é amplamente reconhecida como indicadora de contaminação fecal, assumindo um papel auxiliar na determinação da qualidade de amostras de águas e alimentos. *C. perfringens* é o mais importante sulfito redutor dentro do género *Clostridium*, este microrganismo encontra-se habitualmente no trato intestinal dos animais e dos humanos, formando também esporos que são mais resistentes ao *stress* ambiental em comparação com as células vegetativas. O facto de este microrganismo formar esporos é uma vantagem para a sua deteção na água. Os esporos têm a capacidade de sobreviver na água durante vários meses, muito mais tempo que os microrganismos indicadores fecais vegetativos (Coliformes, *E. coli* e Enterococos) e, conseqüentemente, a sua presença pode indicar uma poluição fecal remota ou intermitente. Os esporos nem sempre são inativados pela desinfeção por cloro (Ashbolt et al., 2001; EA-Part6:2010; ISO 14189:2013).

#### 4.5. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* pertence ao género *Pseudomonas* são bactérias Gram negativas, não esporoladas e catalase positiva. Apresentam um crescimento oxidativo, produzem amónio a partir de acetamida, cerca de 98% das estirpes produzem um pigmento fluorescente na água e cerca de 90% produzem um pigmento azul/verde. Hidrolisam a caseína, mas não o amido e liquefazem a gelatina. A maioria das estirpes conseguem

crescer a 42 °C contudo tal crescimento não é verificado a 4 °C, característica diferenciadora de *P. fluorescens* (ISO 16266:2006).

*P. aeruginosa* é um microrganismo patogénico oportunista, com a capacidade de se desenvolver em águas com baixas concentrações de nutrientes (ISO 16266:2006). Devido à capacidade de se desenvolver em meios pobres, *P. aeruginosa* estão associadas ao declínio da qualidade, incluindo a cor, turvação, sabor e odor (Administração Regional de Saúde do Alentejo, IP (ARSA), 2012a).

A pesquisa de *P. aeruginosa* não pode ser utilizada como indicador de poluição fecal. A presença desta bactéria pode indicar uma avaria precoce no sistema de desinfecção devido a uma maior resistência que os indicadores de contaminação fecal (ISO 16266:2006; *Health Protection Agency* (HPA) W6, 2007).

Em certas circunstâncias pode ser a causa de algumas infeções oportunistas no Homem, especialmente em doentes debilitados. A deteção desta bactéria não é recomendada nos procedimentos de vigilância de águas para consumo humano embora seja uma mais-valia para a qualidade desta, pois este tipo de bactérias deve estar ausente em água para esses fins (ISO 16266:2006; HPA W6:2007; Ali & Osman, 2012).

*Pseudomonas* podem ser encontradas nas mãos, pele humana e no tracto respiratório superior, pelo que são muitas vezes utilizadas na qualidade higio-sanitária de águas e em especial do gelo, como indicadoras de contaminação associada a deficientes práticas de higiene durante a manipulação do produto (Mendes, 2009).

#### 4.6. Estafilococos

Os Estafilococos (Total de Estafilococos) são cocos Gram positivos, com agrupamento predominante em cacho, aeróbios e anaeróbios facultativos, imóveis, produtores de catalase, osmotolerantes, pertencentes à família *Micrococcaceae* e ao género *Staphylococcus*. Algumas destas bactérias produzem enzimas que coagulam o plasma de certos animais (Norma Portuguesa (NP) 4343:1998; Roberts & Greenwood, 2003; Berdoll & Wong, 2006).

Os Estafilococos são bactérias saprófitas da pele do Homem, embora também possam ser encontradas na flora nasal, trato respiratório e intestinal. Estes microrganismos são facilmente transferidas do corpo humano para a água, deste modo, são considerados como bons indicadores de contaminação inter-humana, havendo estirpes que são potencialmente patogénicas, sendo os Estafilococos Produtores de Coagulase (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius*), os mais

prejudiciais para a saúde humana, encontrando-se largamente associado a casos de DOA (NP 4343:1998, Roberts & Greenwood, 2003; WHO, 2001a; Ali & Osman, 2012).

Os Estafilococos não são pesquisados em água para consumo humano, mas é considerado uma boa prática, sendo que algumas estirpes de Estafilococos podem ser exigidas em água usadas no fabrico de alimentos, fármacos e nos hospitais.

## **5. Objetivos**

Face ao exposto foram objetivos gerais deste trabalho:

- Avaliar a qualidade microbiológica do gelo usado pelos estabelecimentos de restauração e bebidas na cidade de Évora e identificar potenciais riscos para a saúde associados ao seu consumo;
- Avaliar as condições de higiene e de implementação de requisitos associados à Segurança Alimentar nos estabelecimentos referidos.

Foram objetivos específicos:

- Caracterizar o gelo microbiologicamente através dos parâmetros associados à qualidade da água e adicionalmente *P. aeruginosa* e Estafilococos (Totais e Coagulase Positiva);
- Estabelecer associações entre a avaliação da qualidade microbiológica do gelo e outras variáveis como: tipo de estabelecimento, método de produção de gelo, cloro residual;
- Relacionar a avaliação dos requisitos analisados com a qualidade microbiológica do gelo.

## **II. Materiais e Métodos**

### **1. Descrição do estudo**

A realização do presente estudo teve por base a caracterização microbiológica do gelo e estabelecer uma relação com a caracterização de campo e os fatores que possam ter interferência na sua qualidade.

Neste estudo foram colhidas (em condições de assepsia) as amostras de gelo para serem analisadas laboratorialmente e por último foram amostradas a água utilizada pelo estabelecimento, assim como do próprio gelo para determinação de parâmetros de campo específicos, tais como pH, cloro residual e cloro total.

A nível laboratorial realizaram-se os parâmetros microbiológicos requeridos pelo DL n.º 306/2007 (parâmetros obrigatórios para assegurar a qualidade da matéria-prima do produto alimentar em estudo) e adicionalmente executaram-se os parâmetros *P. aeruginosa*, Total de Estafilococos e Estafilococos Coagulase Positiva (Estafilococos C+). A análise de parâmetros adicionais ao DL n.º 306/2007 é justificada pelo facto de estes serem por excelência os parâmetros indicadores de contaminação inter-humana e no último estudo realizado em Portugal, Mendes (2009) alertou para a importância da execução destes parâmetros no sentido de se efectuar uma análise mais completa e específica sobre as contaminações do gelo, resultantes do incorreto manuseamento.

### **2. Entidade onde se desenvolveu o estudo**

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Saúde Pública de Évora, laboratório que faz parte dos Laboratórios de Saúde Pública do Alentejo que estão inseridos no Departamento de Saúde Pública e Planeamento da Administração Regional de Saúde do Alentejo IP (ARSA).

No papel dos Laboratórios de Saúde Pública destaca-se a competência do apoio analítico às actividades desenvolvidas pelos Serviços de Saúde Pública, tanto de âmbito regional como local, no âmbito da vigilância sanitária, da investigação, e ainda no da cooperação com outras entidades ou sectores.

O grande desafio colocado aos Laboratórios de Saúde Pública do Alentejo, é de adequar a sua missão de forma a responder aos problemas com que se confronta a Saúde Pública na actualidade e todos os serviços de Saúde Regionais, com níveis de qualidade que sejam uma referência para a Região.

Os Laboratórios de Saúde Pública do Alentejo são constituídos por três Pólos (Beja, Évora e Portalegre) que funcionam em complementaridade de serviços com o objectivo de serem abrangidas o maior número de áreas analíticas.

A zona de acção do Laboratório de Saúde Pública de Évora centra-se nos 14 concelhos do distrito de Évora, mais quatro dos cinco concelhos do Litoral Alentejano, designadamente: Alcácer do Sal, Grândola, Santiago do Cacém e Sines.

O Laboratório de Saúde Pública de Évora desenvolve atividades na área da clínica, da Higiene e Segurança Alimentar e das análises químicas, microbiológicas e biológicas de águas.

No âmbito das análises clínicas, o Laboratório efetua exames diretos e culturais para pesquisa de micobactérias, responsáveis pela Tuberculose bem como colheitas para pesquisa de tuberculose latente (Teste IGRA). Ainda neste âmbito, o Laboratório é responsável pela execução das análises associadas ao Rastreio do Cancro do Colon e Recto desenvolvido pela ARSA desde 2011.

Na área da Higiene e Segurança Alimentar, o Laboratório apoia, através da realização de análises que verificam o nível de higienização das mãos dos manipuladores, assim como das superfícies alimentares associados a estabelecimento de restauração coletiva, o cumprimento das boas práticas em segurança alimentar.

Contudo a sua actividade principal centra-se na vigilância da qualidade da água dos sistemas de abastecimento para consumo humano, piscinas recreativas, piscinas de empreendimentos turísticos e piscinas para fins terapêuticos, executando ainda análises de águas de outra proveniência, nomeadamente hemodiálise, balneares, furos, poços, entre outros. Para este tipo de amostras o Laboratório tem disponíveis/implementados 18 ensaios químicos, 11 ensaios microbiológicos e três ensaios biológicos.

Desde 2005 que o Laboratório viu a sua competência reconhecida ao ser-lhe concedido o estatuto de laboratório com ensaios acreditados pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) de acordo com a norma ISO 17025 de 2005, tendo-lhe sido atribuído o Anexo Técnico de Acreditação nº L0424-2, para 14 dos ensaios efetuados no setor da Química e sete do setor da Microbiologia de águas.

De referir que à excepção dos parâmetros Estafilococos, todos os métodos microbiológicos utilizados neste trabalho se encontram acreditados pelo IPAC para vários tipos de água onde se inclui a água para consumo humano e como tal, o gelo para o mesmo fim. A acreditação do Laboratório é condição essencial para credibilizar e conferir transparência e qualidade durante todo o processo analítico.

O Laboratório faz ainda parte da lista de laboratórios aptos para a realização de análises de água destinada ao consumo humano, no âmbito do DL n° 306/2007, emitida pela Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR).

A realização do presente trabalho insere-se num estudo prévio, com a finalidade de ser englobado no âmbito dos programas de vigilância sanitária desenvolvidos pela ARSA, pelo que careceu da elaboração de um projeto piloto que foi aprovado pela Diretora do Departamento de Saúde Pública e Planeamento. A partir dos resultados obtidos no estudo será tomada a decisão de implementar ou não o programa de vigilância.

### **3. Universo do estudo**

O universo deste estudo foi constituído por 31 estabelecimentos de restauração e bebidas da cidade de Évora.

Teve por base uma amostragem aleatória desses estabelecimentos que obedecessem aos seguintes critérios: servissem bebidas com gelo e que funcionassem durante o horário de funcionamento do Laboratório.

Évora foi a zona selecionada, visto ser a que melhores condições apresenta para realização deste estudo em termos de relação número de Pessoas/Turistas /Estabelecimentos/Proximidade Laboratorial.

A caracterização do universo estudado neste trabalho foi realizada com base nas respostas obtidas na “Ficha de Identificação de Amostra” (Anexo 1). Os itens usados para esta caracterização foram: tipo de estabelecimento, tipo de abastecimento de água e tipo/método de produção de gelo.

Os estabelecimentos foram classificados em três tipos: Restaurante, Café/Bar/Cafetaria e Hotel. Ao contrário do descrito na “Ficha de Identificação da Amostra”, optou-se por agrupar as amostras colhidas em bares e Restaurantes de estabelecimentos hoteleiros numa só categoria. Esta decisão prendeu-se com o facto de se ter verificado que, independentemente de se colher o gelo na zona do bar ou do Restaurante, a máquina e os processos associados são, na maioria dos casos, os mesmos. Para além disso, ao nível da hotelaria já existe uma maior preocupação com a qualidade do gelo, principalmente em Hotéis pertencentes a grandes cadeias, onde foi transmitido que, aquando das auditorias internas, eram muitas vezes colhidas amostras de gelo para análise. Adicionalmente, verificou-se a existência de poucas amostras para a categoria Hotel, que sendo subdivididas iriam ficar com um número reduzido de amostras.

No tipo de abastecimento de água comprovou-se que todos os estabelecimentos visitados eram fornecidos pelo sistema público de abastecimento de águas. Tal facto, fez com que não fosse necessário a colheita e análise microbiológica de água. Essa análise tinha como objectivo averiguar a qualidade da água usada pelo estabelecimento e posteriores implicações na qualidade do gelo produzido. Tratando-se de um abastecimento público de água, a qualidade do produto é controlada pela entidade responsável pelo seu fornecimento e vigiada através de instituições associadas ao Ministério da Saúde pelo que apresentará a qualidade exigida no âmbito do consumo humano.

O método de produção de gelo utilizado pelos estabelecimentos foi proveniente de três métodos diferentes: comercial (industrial), produzido pelo próprio estabelecimento, (através de máquina própria para esse fim) ou de forma mais rudimentar através de cuvetes ou sacos de congelação.

Realça-se que foi efetuado um número considerável de visitas a outros estabelecimentos em que não foi possível desenvolver os procedimentos necessários para os englobar no presente trabalho. Estas situações resultaram do facto de alguns estabelecimentos não terem gelo, a quantidade de gelo existente ser insuficiente para a realização das análises microbiológicas, entre outras.

#### **4. Amostras ensaiadas**

Foi analisada uma amostra de gelo utilizado para consumo humano por estabelecimento, o que fez 31 amostras analisadas na sua totalidade (Anexos 9 e 10). As amostras foram colhidas entre Julho e Setembro de 2014, durante o período da manhã e transportadas até ao Laboratório no interior de malas térmicas num prazo máximo de 4 h após a colheita.

Na Tabela 3, encontram-se distribuídas as 31 amostras analisadas em função do tipo de estabelecimento e o método de produção de gelo utilizado. As amostras colhidas em Restaurantes foram de aproximadamente metade da população amostrada e a outra metade distribuiu-se de forma semelhante pelos tipos Hotel e Café/Bar/Cafetaria.

Tabela 3 - Distribuição das amostras colhidas em função do tipo de estabelecimento e método de produção de gelo

Tipo de estabelecimento	Método de produção de Gelo			Total (%)
	Produzido internamente		Industrial	
	Máquina	Cuvetes/Sacos		
Restaurante	13	1	1	15 (48,4)
Café/Bar/Cafeteria	8	1	--	9 (29,0)
Hotel (Restaurantes/Bar)	7	--	--	7 (22,6)
<b>Total (%)</b>	28 (90,3)	2 (6,5)	1 (3,2)	31 (100)

## 5. Metodologia

### 5.1. Amostragem

O procedimento de amostragem utilizado resultou da adaptação do procedimento utilizado pelo Laboratório de Saúde Pública – Pólo de Évora para a realização de colheitas de águas para análises microbiológicas (ARSA, 2012b) e da norma ISO 19458, 2006. De uma forma muito simplista, as amostras foram colhidas, respeitando as regras de assepsia de modo a garantir que não eram contaminadas no procedimento da colheita.

### 5.2. Parâmetros “*in loco*” ou de campo

Os parâmetros de campo que foram pesquisados foram: pH, cloro residual e cloro total, tanto na água que abastece a máquina de produção de gelo e do próprio estabelecimento, assim como do gelo.

Estas determinações foram realizadas no equipamento portátil de Medidor de pH, Cloro e Ácido Cianúrico, modelo HI 96104C da Hanna Instruments pela técnica de espectrofotometria (incluindo o pH). Este método fotométrico é baseado no desenvolvimento de um componente absorvente a partir de uma reação química entre amostra e reagentes, associada a um comprimento de onda específico ([www.hanna.com](http://www.hanna.com)).

As determinações realizadas nas amostras de gelo foram efectuadas após a total liquefação do gelo.

### 5.3. Parâmetros laboratoriais - microbiológicos

No desenvolvimento de todo o trabalho laboratorial, o produto gelo foi considerado como potencialmente infeccioso tendo sido manipulado como tal, devido ao risco

sempre existente de contacto com microrganismos patogénicos, sempre de acordo com as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e os requisitos inerentes a um laboratório acreditado, incluindo todos os procedimentos de controlo analítico implementados no laboratório.

As amostras foram rececionadas no Laboratório e numeradas, de modo a rastreá-las ao longo de todo o processo desenvolvido laboratorialmente.

Tratando-se de análises microbiológicas de água, as orientações internacionais (ISO 19458:2006) obrigam a realização destas análises num prazo máximo de 6 h após a colheita. Nesse sentido e partindo do princípio que necessitávamos da amostra no estado líquido num tempo limitado, estas foram colocadas à temperatura ambiente num agitador (em velocidade reduzida) até ao momento antes da liquefação completa. Posteriormente as amostras foram transferidas para o frigorífico ( $5\pm 3$  °C), onde foram conservadas até à realização das análises.

Os parâmetros microbiológicos realizados, assim como os métodos encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros microbiológicos e respetivos métodos utilizados na determinação destes parâmetros nas amostras de gelo

Parâmetros	Método
Quantificação de MC a 22 °C	ISO 6222:1999 Método de Incorporação
Quantificação de MC a 36 °C	ISO 6222:1999 Método de Incorporação
Pesquisa e Quantificação de Bactérias Coliformes	PT E-M-002 (ISO 9308-1:2000) Método de Membrana Filtrante
Pesquisa e Quantificação de <i>E. coli</i>	PT E-M-002 (ISO 9308-1:2000) Método de Membrana Filtrante
Pesquisa e Quantificação de Enterococos Intestinais	ISO 7899-2:2000 Método de Membrana Filtrante
Pesquisa e Quantificação de <i>C. perfringens</i>	PT E-M-009 (EA:2010-Parte 6) Método de Membrana Filtrante
Pesquisa e Quantificação de <i>P. aeruginosa</i>	PT E-M-005 (ISO 16266:2006) Método de Membrana Filtrante
Pesquisa e Quantificação de Total de Estafilococos e Estafilococos C+	NP 4343:1998 Método de Membrana Filtrante

em que PT E-M-XXX, significa procedimento interno do Laboratório baseado no documento normativo que se encontram entre parêntesis; NP: Norma Portuguesa.

De forma a minimizar o risco de contaminação e como indicam as BPL, foram realizados em primeiro lugar os parâmetros que utilizam os métodos de incorporação e posteriormente os parâmetros associados aos métodos de filtração por membrana.

Dentro dos parâmetros que utilizam o método de filtração por membrana, deve-se filtrar em primeiro lugar a amostra referente à quantificação de *Estafilococos* (visto ser o parâmetro que mais risco acarreta em termos de poder ser contaminado por parte do operador e/ou ambiente).

### 5.3.1. Método de incorporação

O método de incorporação foi utilizado para a Quantificação de MC a 22 °C e a 36 °C. Este método consiste na inoculação de um volume conhecido de amostra e incorporação em meio liquefeito, misturando de imediato de modo a obter uma repartição homogênea dos microrganismos por toda a placa, seguido de incubação a temperatura ideal de modo a favorecer o crescimento dos microrganismos em estudo (ISO 8199:2005).

O método utilizado para a quantificação de MC a 22 °C e a 36 °C é definido pela norma ISO 6222:1999. A amplitude de resultados do método assim como do volume inoculado e expressão de resultados encontram-se descritos na Tabela 5. O volume inoculado foi ajustado em função da amplitude de resultados de método e aos valores limite referidos pelas várias entidades (de acordo com a Tabela 2).

Tabela 5 - Características do método descrito na ISO 6222:1999, respetivo volume inoculado e amplitude de resultados

Parâmetros	Amplitude de resultados do método	Volume de amostra inoculado/analísado	Expressão de resultados
MC a 22 °C	0-300 ufc por placa	0,1 e 1 mL	0-3000 ufc ml <sup>-1</sup>
MC a 36 °C	(ISO 6222:1999)		

O procedimento para a determinação de MC a 22 °C e a 36 °C são idênticos apenas diferenciando a temperatura e o tempo de incubação. Após ter sido incorporado o meio e deste ter solidificado, as placas foram colocadas em estufas programadas para as temperaturas referidas, com uma tolerância de  $\pm 2$  °C.

Foi utilizado o meio de cultura sólido não selectivo *Yeast Extract Agar* (YEA) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Trata-se de um meio rico em nutrientes que permite detetar e recuperar um grande número de microrganismos (bactérias, leveduras e bolores) nas temperaturas de incubação acima referidas. O meio é constituído por

peptona de caseína, *yeast extract* e agar. Os primeiros dois constituintes para além de servirem como fonte de carbono são ainda fonte de azoto, vitaminas e fatores de crescimento e o agar é utilizado como agente solidificante ([www.merckmilipore.com](http://www.merckmilipore.com)).

O procedimento experimental que foi utilizado para a pesquisa dos parâmetros encontra-se explicado no Anexo 2 em forma de fluxograma.

A partir do número de colónias visualizadas e quantificadas no meio, determinou-se o número de ufc mL<sup>-1</sup> de acordo com o descrito na ISO 8199:2005.

Em caso de contagem superiores a 300 ufc na placa inoculada com 1 mL, essa contagem foi excluída servindo apenas para efeitos de cálculos as colónias contadas na placa inoculada com 0,1 mL.

### 5.3.2. Método de filtração por membrana

A filtração de um modo geral é um método que consiste em fazer passar um volume considerável de amostra através de uma membrana esterilizada e com uma porosidade definida (normalmente 0,45 µm) onde ficarão retidos os microrganismos, com o auxílio de uma bomba de vácuo. A membrana é colocada sobre a grelha na base do filtro com o auxílio de uma pinça esterilizada. Coloca-se então a amostra no funil. Após a filtração coloca-se a membrana sobre a superfície da placa de Petri com o meio de cultura seletivo, para a deteção dos microrganismos (Figura 1). A filtração é um método bastante útil para analisar amostras líquidas, límpidas e com nível de microrganismos muito reduzidos (Roberts & Greenwood, 2003; ISO 8199:2005).



Figura 1- Sistema de Filtração por Membrana (Fonte: autor)

A amplitude de resultados dos métodos que utilizam a técnica de filtração assim como do volume filtrado e expressão de resultados encontram-se descritos na Tabela 6.

As características dos métodos foram adaptadas da ISO 8199:2005 e de Lightfoot & Maier (2003) à exceção do método para Estafilococos cujos dados foram obtidos a partir da NP 4343:1998. O volume teve como referencial as unidades laboratoriais definidas pelo DL n.º 306/2007 para os parâmetros microbiológicos.

Tabela 6 - Características do método de filtração por membrana e respetivo volume filtrado e amplitude de resultados.

Parâmetros	Amplitude de resultados do método	Volume de amostra filtrada/analísado	Expressão de resultados
Pesquisa e Quantificação de Bactérias Coliformes			
Pesquisa e Quantificação de <i>E. coli</i>			
Pesquisa e Quantificação de Enterococos Intestinais	0-80 ufc por membrana	100 mL	0-80 ufc 100mL <sup>-1</sup>
Pesquisa e Quantificação de <i>C. perfringens</i>			
Pesquisa e Quantificação de <i>P. aeruginosa</i>			
Pesquisa e Quantificação de Total de Estafilococos e Estafilococos C+	0-100 ufc por membrana		0-100 ufc 100 mL <sup>-1</sup>

#### 5.3.2.1. Pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes e *Escherichia coli*

O método que foi usado para a determinação destes parâmetros é um método interno baseado na norma internacional ISO 9308-1:200 e na Recomendação do IRAR n.º 5/2005, completamente validado por comparação com outros métodos normalizados, sendo amplamente usado nos Laboratórios Portugueses.

Neste procedimento foi utilizado o meio de isolamento *Membrane Lauryl Sulphate Agar* (MLSA) (Oxoid Limited, Hampshire, Inglaterra) com a constituição de acordo com a Recomendação n.º5/2005 do IRAR.

O princípio do meio é baseado na capacidade que as Bactérias Coliformes têm para hidrolisar a lactose com produção de subprodutos ácidos, levando a uma redução do pH do meio. Esta redução de pH, devido à presença do indicador, vermelho de fenol, provoca uma viragem no meio, ocorrendo o desenvolvimento de uma coloração amarela na zona envolvente à colónia, assim como da própria colónia (Figura 2). O lauril sulfato de sódio é usado como agente seletivo, inibindo outras bactérias diferentes dos coliformes, sendo que este composto também é responsável pela inibição completa das bactérias aeróbias esporuladas ([www.condalab.com](http://www.condalab.com)).

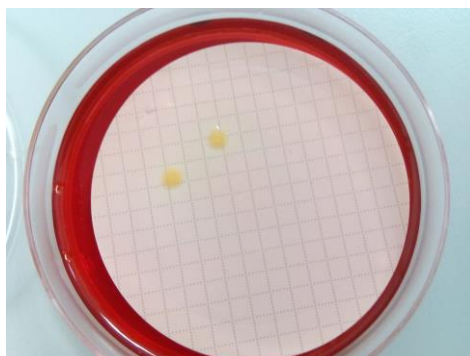


Figura 2 - Colónias características de Bactérias Coliformes/*E. coli* em meio MLSA (Fonte: autor)

Para a realização de isolamento das colónias suspeitas, com o intuito de se efectuar os testes de confirmação foi usado o meio neutro YEA.

Em termos de confirmação foram realizadas as seguintes testes/meios complementares:

- Teste de oxidase: utilizou-se um reagente preparado internamente que tem como único composto o N, N, N', N'-Tetrametil-p-fenilediamina dihidroclorato (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a 1% e que no estado reduzido é incolor e roxo no estado oxidado. Este teste detecta a presença da enzima citocromo oxidase, a qual na presença do reagente de oxidase oxida a fenilenodiamina presente no reagente provocando uma alteração de cor para roxo. Teste de extrema importância para diferenciar *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* (Harrigan, 1998).

Para a realização desta prova deitaram-se duas a três gotas do reagente de oxidase sobre um papel de filtro, colocado previamente numa caixa de Petri. Com a ajuda de uma ansa descartável retirou-se parte da cultura do meio YEA e colocou-se sobre o papel de filtro. A prova foi considerada negativa nos casos em que não surgiu uma coloração azul púrpura ao fim de 30 s.

- Meio Fluorocult – DEV Caldo Lactosado de Peptona (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) apresenta a constituição de acordo com a Recomendação 5/2005 do IRAR. Este meio foi normalmente utilizado para confirmação da presença de *E.coli*, contudo (quando incubado a 36 °C) também foi utilizado na confirmação das colónias com fermentação da lactose duvidosa no meio MLSA.

O funcionamento deste meio, numa primeira fase baseia-se na capacidade que *E. coli* tem para fermentar a lactose a 44 °C, acidificando o meio e provocando a mudança de roxo para amarelo graças ao indicador de pH púrpura de bromocresol (Figura 3).

Numa 2ª fase é necessário verificar a presença da enzima  $\beta$ -glucuronidase (específica das estirpes de *E. coli*). Para este ensaio, os tubos em que foi observada a fermentação

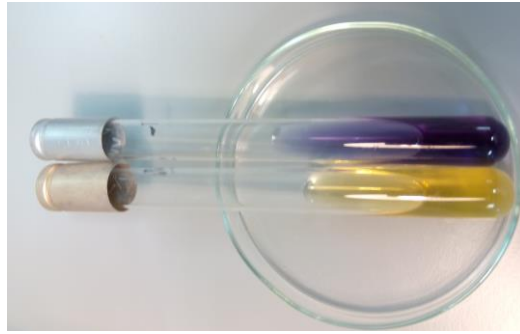


Figura 3 - Teste da fermentação da lactose em meio Fluorocult (Tubo em cima-fermentação negativa; Tubo em baixo-fermentação positiva) (Fonte: autor)

da lactose, foram colocados numa câmara de UV para verificar a emissão de fluorescência, indicativa da presença da enzima referida que ao degradar o 4-metil-lumbeliferil- $\beta$ -D-glucuronidase (MUG) existente no meio, emite fluorescência (Figura 4).

Por último, nos tubos em que o teste de fluorescência se revelou negativo, foi pesquisada a presença de indol proveniente da degradação do aminoácido triptofano. A sua presença foi confirmada com o aparecimento de um anel de cor vermelho cereja após adição de umas gotas de reagente de *Kovac's* (Biogerm, Santo Tirso, Portugal) (Figura 4).

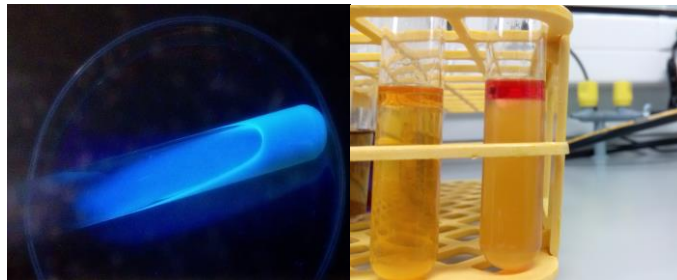


Figura 4 – Meio de Fluorocult: Teste positivo para a Fluorescência (foto da esquerda); Teste do indol (foto da direita), em que o tubo do lado direito corresponde a teste positivo e tubo do lado esquerdo, a teste negativo (Fonte: autor)

O procedimento experimental que foi utilizado para a pesquisa dos parâmetros encontra-se descrito no Anexo 4 em forma de fluxograma.

Segundo o método usado, as Bactérias Coliformes são bactérias que fermentam a lactose a 36 °C com produção de ácido e são oxidase negativa. *E. coli* são Bactérias Coliformes que apresentam a capacidade de fermentar a lactose a 44 °C com produção

de ácido e apresentam fluorescência e/ ou responde positivamente ao teste do indol (ISO 9308-1:2000; Recomendação IRAR n.º5, 2005).

A partir do número de colónias quantificadas na membrana, do número de colónias repicadas por cada sector (colónias com as mesmas características) e tendo em conta os resultados dos ensaios de confirmação que foram efectuados, calculou-se o número de ufc 100 mL<sup>-1</sup> para Bactérias Coliformes e *E. coli*, de acordo com o descrito na ISO 8199:2005.

#### 5.3.2.2. Pesquisa e quantificação de Enterococos Intestinais

O método que foi usado para a determinação deste parâmetro foi o método padronizado pela ISO 7899-2:1998.

Neste método foi usado o meio de isolamento *Slanetz & Bartley* (Oxoid Limited, Hampshire, Inglaterra) com constituição concordante com a norma. Este meio fornecido por esta marca apresentou a vantagem (em relação ao descrito na norma) de ter já incluído o suplemento *2,3,5-trifeniltetrazolium choride* na sua constituição.

O princípio do meio de isolamento é baseado na capacidade que os Enterococos Intestinais têm para reduzir *2,3,5-trifeniltetrazolium chloride* (corante incolor), produzindo a formazina (corante vermelho). Esta reação foi observada através da coloração das colónias (que varia entre o rosa, vermelho e castanho), uma vez que a formazina localiza-se no interior das células fazendo com que estas adquiram a coloração específica (Figura 5). A azida de sódio, presente na constituição do meio, é o agente selectivo e tem como objectivo inibir o crescimento de bactérias Gram negativas.

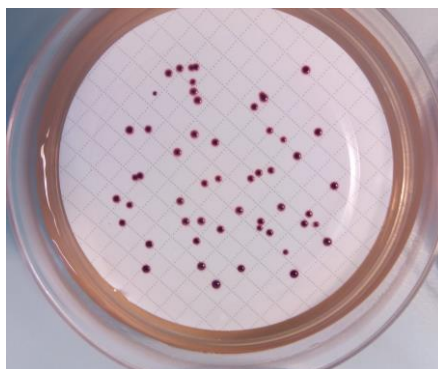


Figura 5 - Colónias características de Enterococos Intestinais em meio *Slanetz and Bartley* (Fonte: autor)

Os restantes compostos do meio têm como finalidade garantir os nutrientes necessários ao crescimento das bactérias pretendidas, sendo que a glucose é usada como fonte de

carbono, *yeast extract* de aminoácidos e vitaminas e o fosfato hidrogênio dipotássico permite manter o equilíbrio osmótico do meio (ISO 7899-2:1998; [www.liofilchem.net](http://www.liofilchem.net)). As colónias com a coloração característica foram posteriormente transferidas para o meio Biles Esculina Azida Agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, França), pré-aquecida a 44 °C. Os Enterococos Intestinais hidrolisaram a esculina presente neste meio em 2 h originando o produto final 6,7-dihidroxycumarina, que formou um complexo com iões de ferro (III) provenientes do citrato férrico de amónio (constituente do meio), originando uma coloração bronze a negro que se difundiu no meio. A presença de azida de sódio tem como finalidade inibir alguma contaminação por parte de bactérias Gram negativas. Este teste é de extrema importância no sentido de diferenciar os Enterococos dos Estafilococos, assim como de *Listeria* ([www.solabia.fr](http://www.solabia.fr)).

O procedimento experimental que foi utilizado para a pesquisa do parâmetro encontra-se descrito no Anexo 3 em forma de fluxograma.

A partir do número de colónias que se desenvolveram sobre a membrana no meio *Slanetz and Bartley* com a coloração característica e que produziram enegrecimento no meio Biles Esculina Azida Agar obteve-se o valor de ufc 100 mL<sup>-1</sup> para Enterococos Intestinais.

#### 5.3.2.3. Pesquisa e quantificação de *Clostridium perfringens*

O método que foi usado para a determinação deste parâmetro é um método interno baseado no documento EA – Part 6 (2010) e completamente validado por comparação com outros métodos normalizados.

Neste procedimento foi utilizado como meio de isolamento o meio Triptose-Sulfito-Cicloserina Agar (TSC) Agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) com a constituição concordante com o referido no documento EA – Part 6 (2010).

O princípio do meio é baseado na capacidade, que as bactérias típicas de *C. perfringens* têm, para reduzir o sulfito (presente no meio) a sulfureto, reagindo posteriormente com o sal férrico presente no meio de cultura (citrato férrico) formando um precipitado negro, fazendo com que as colónias adquiram essa cor, assim como o meio envolvente. O antibiótico D-cicloserina (composto selectivo inibitório) impede o desenvolvimento da flora contaminante em especial das outras espécies de *Clostridium* e reduzindo o tamanho dos halos negros à volta das colónias ([www.solabia.fr](http://www.solabia.fr)).

A incubação decorreu em condições de anaerobiose, com recurso a uma jarra de anaerobiose com um sistema gerador de condições de atmosfera isente de oxigénio,

*Anaerogen* (Oxoid Limited, Hampshire, Inglaterra). O oxigénio atmosférico na jarra é rapidamente absorvido pelo sistema gerador com a produção simultânea de dióxido de carbono (não necessitando de catalisador) ([www.oxoid.com/UK/blue/](http://www.oxoid.com/UK/blue/)).

Para controlar as condições exigidas, foi utilizado um indicador de anaerobiose no interior da jarra (*Anaerotest*, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). O indicador contém um corante, azul de metileno, que na presença de oxigénio adquire a cor azul, já em condições anaeróbias o corante é reduzido ficando incolor ([www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com)).

As colónias características foram posteriormente repicadas em Gelose de Sangue (Biogerm, Santo Tirso, Portugal). Repicagem que ocorre em placas paralelas, uma foi incubada em condições de anaerobiose e a outra de aerobiose. Este teste serve para eliminar eventuais bactérias contaminantes que não sejam estritamente anaeróbias. As estirpes de *C. perfringens* apenas cresceram na placa incubada em condições de anaerobiose. Colónias típicas apresentam ainda um halo resultante da hemólise no meio. Para confirmação de *C. perfringens* foram realizadas, a partir das colónias repicadas (em condições de anaerobiose), inoculações em paralelo para dois meios multifuncionais: Nitrato-Mobilidade e Lactose-Gelatina (ambos da Biogerm, Santo Tirso, Portugal). Antes da sementeira, estes meios foram regenerados (100 °C, 15 min) com o objetivo de expulsar todo o oxigénio dissolvido no meio.

Meio Nitrato-Mobilidade: o princípio do meio baseia-se na pesquisa da enzima nitrato-redutase (enzima com a capacidade de reduzir os nitrato) e a ausência de estruturas de locomoção por parte dos organismos alvo (HPA W5:2007).

A presença da enzima nitrato-redutase nas colónias características é verificada pelo aparecimento da cor vermelha, após adição dos reagentes Nitrato A e Nitrato B (ambos da Biogerm, Santo Tirso, Portugal), indicativo da redução do nitrato (existente no meio) a nitritos. Na ausência da coloração vermelha (ausência de nitritos), pode indicar que os nitratos existentes no meio foram reduzidos a amónia. Esta prova é verificada através da ausência de desenvolvimento de cor vermelha aquando da adição do pó de zinco (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). A coloração vermelha aquando da adição do pó de zinco é indicativa da presença de nitrato no meio e resulta da redução dos nitratos a nitritos, por recurso ao zinco adicionado, composto que se ligou aos reagentes de Nitrato A e Nitrato B (adicionados anteriormente) e formando um composto de coloração avermelhada (indicativo de uma resposta negativa ao teste) ([www.bd.com](http://www.bd.com)).

A ausência de estrutura de locomoção que permita a mobilidade é verificada pelo crescimento celular circunscrito à zona da picada de inoculação (HPA W5:2007).

Meio Lactose-Gelatina: este meio baseia-se no facto de estas bactérias apresentarem a capacidade de fermentar a lactose com produção do gás (sulfureto de hidrogénio), com respetiva alteração de pH do meio e correspondente alteração de cor (de vermelho para amarelo), devido ao indicador de pH (vermelho de fenol). A presença da enzima gelatinase com capacidade de hidrolisar a gelatina foi comprovada pela liquefação do meio quando sujeito a temperaturas de frio ([www.condalab.com](http://www.condalab.com)).

O procedimento experimental que foi utilizado para a pesquisa deste parâmetro encontra-se descrito no Anexo 5 em forma de fluxograma.

Segundo o método usado, *C. perfringens* são bactérias que apresentam uma coloração negra (predominantemente), cinza, amarela ou acastanhada em meio TSC Agar, crescem exclusivamente em condições de anaerobiose, imóveis, com a capacidade de reduzir os nitratos a nitritos ou amónia, fermentam a lactose com produção de ácido e liquefazem a gelatina.

A partir do número de colónias quantificadas na membrana, do número de colónias repicadas por cada sector (colónias com as mesmas características) e tendo em conta os resultados dos ensaios de confirmação foi determinado o número de ufc 100 mL<sup>-1</sup> para *C. perfringens*, de acordo com o descrito na ISO 8199:2005.

#### 5.3.2.4. Pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*

O método que foi usado para a determinação deste parâmetro é um método interno baseado na ISO 16266:2006, completamente validado por comparação com outros métodos normalizados.

Neste procedimento foi utilizado como meio de isolamento o meio *CN Agar* (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, França) com constituição idêntica à da norma em que o método é baseado.

O princípio do meio é baseado na capacidade que os microrganismos alvo têm em produzir piocianina. Este meio sólido seletivo, contém cetrimida, que apresenta um amónio quaternário que inibe o crescimento da maior parte dos microrganismos, permitindo o desenvolvimento de *P. aeruginosa* com produção de piocianina, composto este, de cor azul esverdeada que se difunde no meio periférico às colónias (Figura 6). A adição do ácido nalidíxico à cetrimida permite uma maior recuperação de *P. aeruginosa*, com aumento da produção de pigmento enquanto a flora contaminante nomeadamente *Proteus* e *Klebsiella* são fortemente inibidos. O cloreto de magnésio e sulfato de potássio, também eles, constituintes do meio favorecem a produção do

pigmento. A caseína e a gelatina fornecem os nutrientes necessários para uma rápida multiplicação celular e o glicerol é uma fonte de energia e também potencia a produção do pigmento ([www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com); [www.liofilchem.net](http://www.liofilchem.net); [www.solabia.fr](http://www.solabia.fr)).

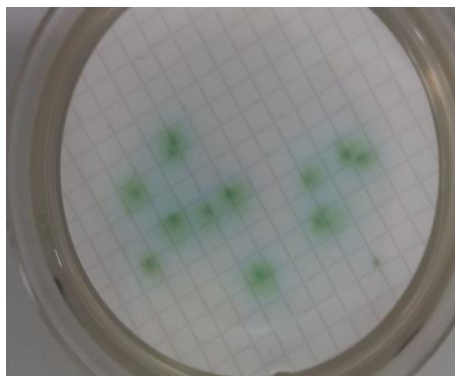


Figura 6 - Colónias características de *P. aeruginosa* em meio CN Agar (Fonte: autor)

Existem ainda *P. aeruginosa* que crescem neste meio mas não têm a capacidade de produzir piocianina mas apresentam fluorescência (fluoresceína) ou adquirem a cor castanho avermelhadas (piorrubina), contudo estas duas características não são exclusivas de *P. aeruginosa* pelo que este tipo de colónias carece de confirmação ([www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com); [www.solabia.fr](http://www.solabia.fr)).

Para confirmação das colónias suspeitas foram realizadas as provas da hidrólise de caseína e da oxidase.

A prova da hidrólise da caseína é realizada através da inoculação directa da colónia que se encontra sobre a membrana pelo método de estria no meio *Skim Milk Cetrimide* (Biogerm, Santo Tirso, Portugal), meio com constituição igual ao definido pelo documento W6:2007 do HPA. Esta prova pesquisa a presença de enzimas proteolíticas que conseguem hidrolisar a caseína provocando a hidrólise do meio envolvente à estria de inoculação. A presença de cetrimida novamente neste meio serve para inibir eventuais bactérias contaminantes (Harrigan, 1998).

Na prova da oxidase (já foi explicada anteriormente) *P. aeruginosa* respondem positivamente a esta prova através do aparecimento de uma coloração azul púrpura e que resulta da existência do citocromo oxidase, enzima específico das bactérias aeróbias estritas (Harrigan, 1998).

O procedimento experimental que foi utilizado para a pesquisa deste parâmetro encontra-se descrito no Anexo 6 em forma de fluxograma.

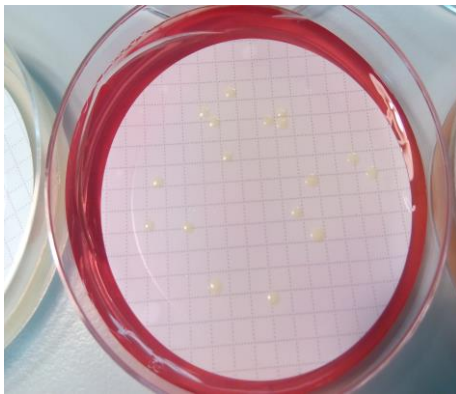
Segundo o método usado, *P. aeruginosa* são bactérias que produzem piocianina (coloração azul/verde) e/ou fluorescência ou coloração acastanha avermelhada que têm a capacidade de hidrolisar a caseína e oxidase positiva.

A partir do número de colónias quantificadas na membrana, do número de colónias repicadas por cada sector (colónias com as mesmas características) e tendo em conta os resultados dos ensaios de confirmação, foi determinado o número de ufc 100 mL<sup>-1</sup> para *P. aeruginosa*, de acordo com o descrito na ISO 8199:2005.

#### 5.3.2.5. Pesquisa e quantificação de Total de Estafilococos e Estafilococos Coagulase Positiva

O método que foi usado para a determinação destes parâmetros segue o documento normativo NP 4343:1998. Neste procedimento foi utilizado como meio de isolamento o meio *Mannitol Salt Agar* (MSA) (Oxoid Limited, Hampshire, Inglaterra) com constituição semelhante à indicada na norma, à exceção da concentração de manitol e vermelho fenol.

O funcionamento do meio baseia-se no facto dos Estafilococos apresentarem a capacidade de fermentar manitol com produção de ácido, mesmo na presença de grandes concentrações de cloreto de sódio. A degradação do manitol é detetada pela mudança de cor do meio envolvente, fruto da diminuição do pH (subprodutos ácidos) que provoca alteração da estrutura do indicador de pH (vermelho de fenol), adquirindo a



cor amarela (Figura 7).

A presença de um considerável teor de cloreto de sódio tem como objectivo obter um meio salino altamente selectivo, onde os microrganismos alvo se conseguem desenvolver, mas impedindo grande parte dos interferentes (Berdoll & Wong, 2006 [www.oxoid.com/UK/blue/](http://www.oxoid.com/UK/blue/)).

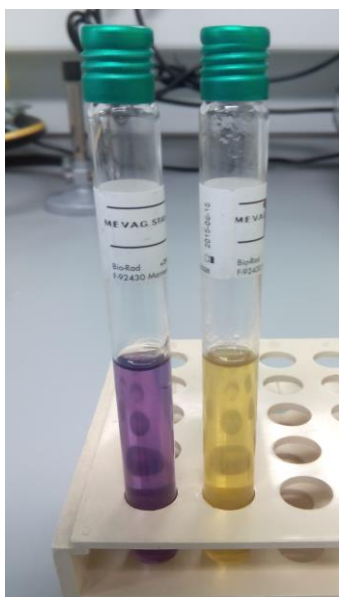
Figura 7 - Colónias características de Estafilococos em meio MSA (Fonte: autor)

As colónias típicas foram repicadas em meio não selectivo (YEA) e posteriormente sujeitas a testes de confirmação que consistiram na coloração de Gram, teste da catalase, tipo respiratório e teste da coagulase.

Coloração de Gram: Os Estafilococos quando coradas e observados ao microscópio apresentam uma forma circular (cocos) agrupados em cachos (preferencialmente) ou até mesmo aos pares e com coloração azul violeta (bactérias Gram positivas). Na realização da coloração foram usados os seguintes produtos: *Gram Crystal Violet*, *Gram Iodine*, *Gram Decolorizer*, *Gram Safranin* (todos da Becton, Dickinson and Company, Maryland, EUA).

Teste da Catalase: A catalase é uma enzima que está presente nos Estafilococos e na maioria das bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas. Nos anaeróbios estritos esta enzima não está presente. O peróxido de hidrogénio é um produto final do metabolismo dos hidratos de carbono pela via oxidativa, sendo um composto extremamente tóxico para os microrganismos, que através da catalase o decompõem em água e oxigénio. A positividade da reação é visualizada pela formação de bolhas quando se emulsionou uma cultura com peróxido de hidrogénio 3% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) com as colónias a testar (Harrigan, 1998).

Tipo Respiratório: Neste teste foi averiguada a capacidade que os Estafilococos possuem para crescer tanto na presença como na ausência de oxigénio.



Para tal foi inoculado através de movimentos helicoidais o meio MEVAG *Staphylococcus* (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, França) que contém glucose, açúcar que é fermentado pelos Estafilococos ao longo de todo o tubo (tanto na presença, como na ausência de oxigénio), provocando uma acidificação do meio, alterando a estrutura do indicador de pH (púrpura de bromocresol) levando a uma mudança de cor no meio para amarelo (Figura 8) ([www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)).

Figura 8 - Meio de MEVAG: Tubo do lado esquerdo - teste negativo; Tubo do lado direito - teste positivo (Fonte: autor)

Teste da coagulase: A enzima coagulase é específica dos Estafilococos Produtores de Coagulase e como o nome indica resulta da capacidade que esta enzima tem em coagular o plasma. Este teste é realizado com o meio *Coagulase Plasma, Rabbit with*

EDTA (Becton, Dickinson and Company, Maryland, EUA) que não requer enriquecimento celular em meio líquido.



Figura 9 – Teste de Coagulase positivo em meio *Coagulase Plasma, Rabbit with EDTA* (Fonte: autor)

O procedimento experimental que foi utilizado para a pesquisa deste parâmetro encontra-se descrito no Anexo 7 em forma de fluxograma.

Segundo o método usado, os Estafilococos Totais são bactérias que se desenvolvem no meio MSA e que são classificadas como cocos Gram positivos, respondem positivamente ao teste da catalase, apresentam um tipo respiratório aeróbio e anaeróbio facultativo e sintetizam a catalase. Os Estafilococos C+ são Estafilococos (totais) que formam coágulos quando sujeitos ao teste da coagulase.

A partir do número de colónias quantificadas na membrana, do número de colónias repicadas por cada sector (colónias com as mesmas características) e tendo em conta os resultados dos ensaios de confirmação foi determinado o número de ufc por 100 mL<sup>-1</sup> para o Total de Estafilococos e Estafilococos C+, de acordo com o descrito na ISO 8199:2005.

#### 5.4. Ficha de caracterização de campo

Adicionalmente às colheitas das amostras foram recolhidas informações *in loco* sobre o cumprimento dos planos HACCP e/ou Boas Práticas em Segurança Alimentar associados aos procedimentos de uso do gelo por recurso à “Ficha de Caracterização de Campo” (Anexo 8).

Esta ficha de campo/questionário foi preenchida aquando das colheitas das amostras, sendo posteriormente associada à amostra de gelo.

Tendo em consideração que não houve repetição do local de colheita para as amostras de gelo, o tamanho da população das respostas às fichas de campo também foi de 31.

A ficha de campo era do tipo quantitativo e qualitativo, tendo por base os objetivos do trabalho e que pretendeu avaliar determinados pontos dos requisitos associados às Boas Práticas em Segurança Alimentar e ao HACCP mas numa perspetiva focada na qualidade do produto gelo e que foi baseada na *Lista de Verificação – Higiene*

*Alimentar na Restauração Colectiva* do Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA (Amorim, 2006.).

A ficha de campo foi estruturada em duas partes:

- Caracterização geral do estabelecimento, associados ao cumprimento de alguns dos requisitos associados à segurança alimentar;
- Boas Práticas de Produção e Manuseamento do gelo, onde se tentou caracterizar o gelo, desde a sua produção até a sua utilização no consumidor final de modo a tentar estabelecer alguma relação com a qualidade microbiológica do gelo.

As fichas foram preenchidas com base nas evidências, assim como nas informações obtidas através da palavra dos manipuladores/responsáveis associados a esses estabelecimentos.

Todos estabelecimentos inquiridos utilizavam o gelo para refrigerar bebidas. Apenas um estabelecimento mencionou que usava o gelo para refrigerar e conservar alimentos através do contacto directo do gelo com os alimentos (item 2).

Os itens associados à caracterização da máquina de produção de gelo (item 4 e diversas alíneas) apenas foi preenchido para as situações em que o gelo disponibilizado aos clientes fosse produzido por máquina de gelo do próprio estabelecimento (n=28).

Outra situação adicional, que impossibilitou o preenchimento dos itens 4.1 ao 4.8, foi num Restaurante que devido às grandes quantidades de gelo utilizado e às limitações de espaço das instalações, tem a máquina instalada num armazém localizado noutro edifício, tendo sido impossível obter informações sobre a mesma.

Verificou-se a existência de uma grande diversidade de máquinas utilizadas para a produção de gelo e todas se encontravam a ser alimentadas com água proveniente do sistema público de abastecimento.

O item 14 contemplava a correcta utilização das luvas descartáveis, contudo aquando das visitas não foi possível verificar a utilização das mesmas uma vez que as colheitas não foram efectuadas pelos manipuladores e nas situações analisadas a utilização das luvas não foi mencionada.

### 5.5. Análise estatística

A exploração inicial dos dados revelou, através de histogramas, caixas de bigodes (*boxplots*) e do teste de *Shapiro-Wilk*, que algumas das variáveis apresentam valores extremos (*outliers*) e/ou distribuição assimétrica, respetivamente, revelando assim a necessidade de uma normalização. Assim, usou-se a transformação angular em dados

proporcionais e logarítmica nas restantes variáveis contínuas. As variáveis de natureza categórica foram decompostas para que cada classe passasse a ser traduzida por uma forma binária.

O processo de análise estatística dos dados foi dividido em três fases distintas: (i) estatística descritiva (média, mediana, desvio-padrão, entre outras), (ii) teste de hipóteses simples (teste não paramétrico *Mann-Whitney* e o teste exato de *Fisher*) para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis e (iii) regressão linear simples (correlação de *Spearman*) para verificar a existência de relações entre variáveis. Recorreu-se aos testes estatísticos não paramétricos visto não estarem reunidos os pressupostos de normalidade dos dados, embora a amostra apresente dimensão superior a 30 ( $n = 31$ ), na maioria das suas variáveis.

O *p-value*, também designado por nível descritivo do teste, é a probabilidade que mede se os dados da amostra sugerem a rejeição da hipótese nula ( $H_0$ ) ser verdadeira. Este cálculo (*p-value*) foi utilizado em todos os testes estatísticos de forma a avaliar estatisticamente a hipótese nula. Para tal, recorreu-se a um nível de significância igual a 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ).

Toda a análise estatística dos dados foi realizada no programa R, versão 3.1.0 (*The R Foundation for Statistical Computing 2014*).

### III. Resultados e Discussão

#### 1. Avaliação global dos resultados microbiológicos do gelo

No anexo 10 encontram-se compilados todos os resultados microbiológicos obtidos durante o estudo e a partir dos quais foram determinados os dados estatísticos para cada um dos parâmetros microbiológicos analisados (Tabela 7).

Devido ao elevado número de resultados nulos ou superiores aos limites de quantificação do método que foram obtidos, optou-se por não fazer a transformação logarítmica desses resultados, à excepção dos MC a 22 °C e a 36 °C, já que a amostragem seria largamente reduzida e os resultados obtidos não expressariam a realidade investigada.

Excluindo os resultados dos MC a 22 °C, a 36 °C e Total de Estafilococos (que serão analisados mais à frente), os parâmetros que apresentaram maior frequência de positividade foram os parâmetros Bactérias Coliformes e Enterococos Intestinais, ambos com 19,4% (seis resultados positivos das 31 determinações efectuadas em cada um dos parâmetros).

Estes valores de frequência são muito semelhantes aos obtidos no estudo realizado no Porto por Mendes (2009), com uma população de 23 amostras. Nesse estudo, Bactérias Coliformes e Enterococos Intestinais foram também os que apresentaram maior número de resultados positivos (21,7% e 17,4%, respetivamente). Em contrapartida Ferreira (2010), num estudo realizado no Brasil com gelo comercial, obteve resultados largamente superiores aos obtidos no presente trabalho, 93,1% e 79,3%, respetivamente. No Reino Unido, Nichols, Gillespie & Louvois (2000) obtiveram 9% de resultados positivos para Bactérias coliformes e 12,3% para Enterococos Intestinais em 143 amostra de gelo usado para refrigerar bebidas. Enquanto a FSAI, no estudo desenvolvido de 2007, constatou uma frequência de 24,8% para Bactérias Coliformes e 4,5% de Enterococos Intestinais.

No presente estudo, observou-se ainda que estes dois parâmetros apresentaram uma amplitude de resultados muito idêntica entre si, 0-14 ufc 100 mL<sup>-1</sup> para Bactérias Coliformes e 0-13 ufc 100 mL<sup>-1</sup> para Enterococos Intestinais.

No que se refere aos parâmetros *E. coli*, assim como *C. perfringens* apenas foram detetados em uma amostra (3,2%) e com valores de ufc muito reduzidos. As frequências obtidas, no estudo de Mendes (2009) para estes parâmetros foi de 4,3% e 8,7%,

respectivamente. Noutros estudos, Nichols et al. (2000) detetou *E. coli* em 1% das amostras e a FSAI no relatório de 2007 obteve 2% de amostras positivas.

Em três (9,7%) das amostras foi detetada *P. aeruginosa*. Igual número foi determinado para os Estafilococos C+, enquanto 20 amostras (64,5 %) apresentaram positividade para os Estafilococos. Ressalta-se que 15% das amostras que apresentaram Estafilococos (totais) continham estirpes de Estafilococos C+.

A amplitude de resultados referentes a estes três últimos parâmetros ultrapassou o valor máximo associado ao método, ou seja, 80 ufc 100 mL<sup>-1</sup> para o parâmetro *P. aeruginosa* e 100 ufc 100 mL<sup>-1</sup> para os dois parâmetros de Estafilococos. Ressalva-se que a totalidade dos resultados positivos de *P. aeruginosa* e Estafilococos C+ corresponde a 30% do total de resultados positivos obtidos para os parâmetros até aqui analisados.

Comparando a percentagem de resultados positivos para *P. aeruginosa* com outros estudos verifica-se que o resultado obtido no presente estudo foi cerca de três vezes superior ao obtido na Grécia por Gerokomou et al. (2011) em amostras de gelo comercial (3%). Também a amplitude de resultados foi menor no referido estudo (1-22 ufc 100 mL<sup>-1</sup>). Noutro estudo desenvolvido pelo *Western Australian Food Monitoring Program* (WAFMP) (1999), verificou-se que a percentagem de amostras em que foi detetada *P. aeruginosa* foi de 4% independentemente do gelo ser ou não comercial.

*P. aeruginosa* sendo um microrganismo oportunista, está associado ao desenvolvimento de doenças graves em pessoas com o sistema imunitário debilitado e a sua presença indica falhas nos procedimentos de manipulação do gelo (WAFMP, 1999).

Para a quantificação de MC a 22 °C e a 36 °C foi utilizado, como já mencionado, um meio sem inibidores, possibilitando o crescimento de todo o tipo de bactérias (e também alguns bolores e leveduras). Assim sendo estes parâmetros quantificam todos os microrganismos que tenham a capacidade de se multiplicar na presença de oxigénio (aeróbios estritos ou facultativos) e nas temperaturas mencionadas.

Deste modo a elevada positividade para a quantificação de MC a 22 °C e a 36 °C está intrínseca às características do produto analisado: matéria-prima não estéril, manipulação humana e à excepção do cloro (originário da matéria prima) não sofre mais nenhum tipo de tratamento que reduza e/ou elimine a carga microbiana.

Dos dados mencionados na Tabela 7 para os MC a 22 °C e a 36 °C destaca-se o valor de mediana de 89 e 19 ufc mL<sup>-1</sup>, respetivamente. Valores estes que são muito próximos quando esta função é calculada após transformação logarítmica dos dados.

Estes valores de mediana também são indicativos da existência de uma maior proporção de microrganismos de origem ambiental (MC a 22 °C) em comparação com os de origem animal (MC a 36 °C).

Tabela 7 - Resumo estatístico dos valores obtidos para os parâmetros microbiológicos

Parâmetro Microbiológico	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Nº de positivos
MC 22 °C	1	>3000*	461 <sup>#</sup> (114 <sup>+</sup> )	89 <sup>#</sup> (88 <sup>+</sup> )	704 <sup>#</sup> (7 <sup>+</sup> )	31 (100)
MC 36 °C	0	2600	198 (30 <sup>+</sup> )	19 (24 <sup>+</sup> )	594 (5,4 <sup>+</sup> )	28 (90,3)
Bact. Coliformes	0	14	1	0	3	6 (19,4)
<i>E. coli</i>	0	1	0	0	0	1 (3,2)
Enterococos	0	13	1	0	3	6 (19,4)
<i>C. perfringens</i>	0	2	0	0	0	1 (3,2)
<i>P. aeruginosa</i>	0	>80*	0 <sup>#</sup>	0 <sup>#</sup>	1 <sup>#</sup>	3 (9,7)
Estafilococos C+	0	>100*	1 <sup>#</sup>	0 <sup>#</sup>	5 <sup>#</sup>	3 (9,7)
Total de	0	>100*	10 <sup>#</sup>	2 <sup>#</sup>	22 <sup>#</sup>	20 (64,5)

As unidades dos resultados dos parâmetros microbiológicos são ufc mL<sup>-1</sup> para os MC a 22 °C e a 36 °C e ufc 100 mL<sup>-1</sup> para os restantes parâmetros; \*Limite superior de quantificação; <sup>#</sup> Valor obtido após exclusão dos valores indeterminados; <sup>+</sup> Valor obtido após a transformação dos resultados obtido em log10, excluindo os valores indeterminados ou nulos e posteriormente aplicou-se o antilog10

## 2. Distribuição dos resultados (histogramas de frequência)

Para uma melhor interpretação/análise dos resultados optou-se por distribuir o valor dos resultados obtidos para MC a 22 °C, MC a 36 °C e Total de Estafilococos por categorias e representação gráfica. A justificação pelo facto não se ter procedido de igual modo para os restantes parâmetros deveu-se ao elevado número de resultados negativos obtidos.

O histograma de MC a 22 °C (Figura 10) mostra a frequência dos resultados obtidos para as amostras de acordo com intervalos relevantes. Constatou-se que mais de 50% dos resultados obtidos se encontravam no intervalo de 0-100 ufc mL<sup>-1</sup>, sendo a restante população distribuída mais ou menos uniformemente pelas restantes categorias (à excepção da ultima categoria, que corresponde ao limite máximo de quantificação do método utilizado).

Mendes (2009) obteve 44% dos resultados abaixo de 300 ufc mL<sup>-1</sup>. Observando os resultados no Anexo 10, verificou-se que essa percentagem foi superior (64,5%), o que poderá indicar melhores condições gerais de higiene, uma vez que a carga microbiana se situa maioritariamente em níveis mais baixos.

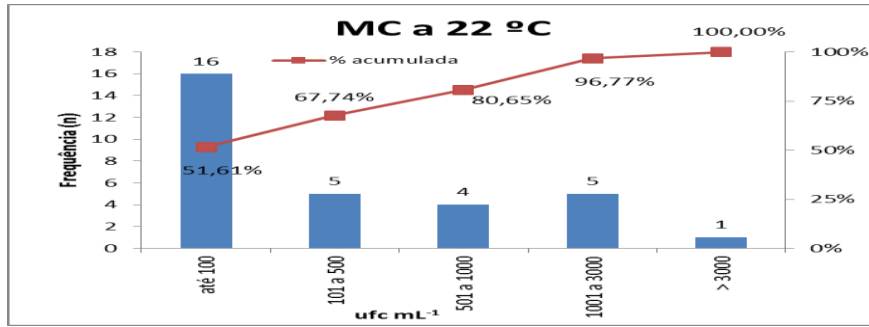


Figura 10 - Histograma dos resultados obtidos para Microrganismos a 22°C

De forma idêntica, construiu-se o histograma para MC a 36 °C (Figura 11) de modo a avaliar a frequência dos resultados obtidos para as amostras de acordo com intervalos relevantes. Constatou-se que a grande maioria, 90,3% dos resultados obtidos se encontravam no intervalo de 0-100 ufc mL<sup>-1</sup> e 51,6% se situavam no intervalo de 0-20 ufc mL<sup>-1</sup>. Apenas se obteve um valor entre os 501 e os 1000 ufc e dois valores na categoria de 1001 a 3000 ufc.

Comparando estes resultados com os resultados obtidos por Mendes (2009) tendo por base os resultados inferiores a 300 ufc mL<sup>-1</sup> e observando os resultados apresentados Anexo 10, constata-se que se obteve mais 16,3% de amostras com resultados nesse intervalo. À semelhança do que foi analisado para o MC a 22 °C verifica-se que o nível de contaminação para o MC a 36 °C obtido no presente estudo também é inferior ao obtido por Mendes (2009).

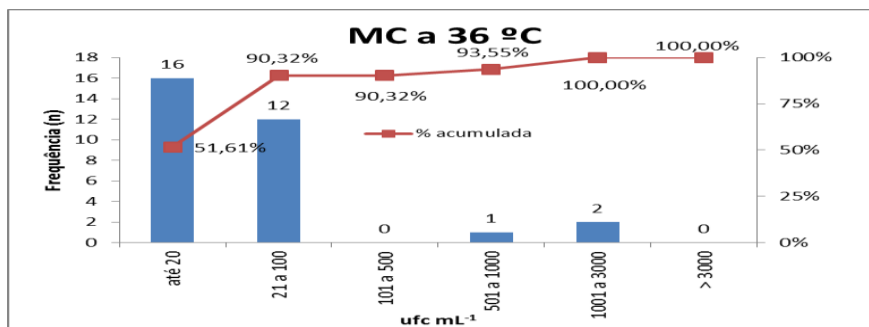


Figura 11 - Histograma dos resultados obtidos para Microrganismos a 36 °C

Efetuuou-se uma regressão linear com o objetivo de verificar se existe alguma relação entre os MC a 22 °C e a 36 °C, embora não esquecendo que ambos os parâmetros são indicativos da presença de microrganismos de diferentes origens (22 °C ambiental e 36 °C, humana). A ideia subjacente era verificar a necessidade de avaliar os MC a 22 °C, visto ser um parâmetro que não é referido pela maioria das entidades que emitiram valores guia para os parâmetros microbiológicos associados à qualidade do gelo.

Utilizou-se o teste correlação de *Spearman* para verificar a existência de referida relação e os dados obtidos foram  $r$  (coeficiente de correlação) = 0,680 associado a um  $p$ -value = 0,000. O valor de  $r$  indicou uma correlação positiva não perfeita (isto é, quando uma variável aumenta, a outro também e embora em proporções diferentes) e valor de  $p$ -value indicou-nos que essa relação é significativa. Este resultado fortalece a ideia da inutilidade da pesquisa dos MC a 22 °C, parâmetro apenas referenciado pelo DL n.º 306/2007.

Através da análise da distribuição dos valores obtidos para Total de Estafilococos, (Figura 12), constatou-se que 35,5% dos resultados determinados foram nulos, 38,7% situou-se entre 1 e 10 ufc 100 mL<sup>-1</sup> e 22,6% dos resultados obtidos foram superiores ao limite superior de quantificação do método (100 ufc 100 mL<sup>-1</sup>).

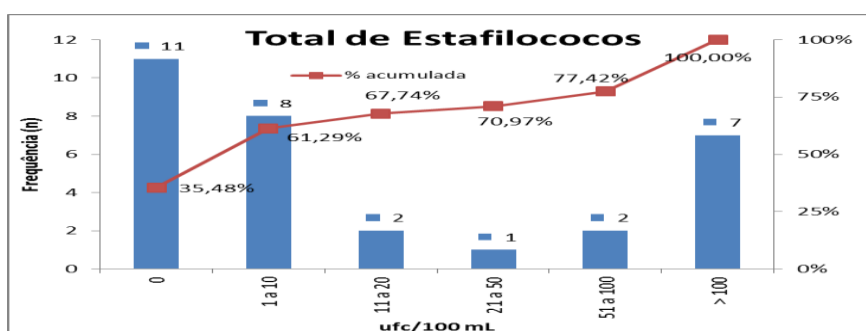


Figura 12 - Histograma dos resultados obtidos para Total de Estafilococos

Testou-se paralelamente a existência de uma correlação entre os MC a 36 °C e o Total de Estafilococos. Este teste tinha como objetivo verificar a importância da pesquisa do parâmetro Total de Estafilococos como uma mais valia para a avaliação do nível de higienização das amostras de gelo em comparação com os MC a 36 °C. Salienta-se que este parâmetro não é mencionado em nenhum dos referenciais da qualidade do gelo, nem da água para consumo humano e como tal também não existe valor guia.

Utilizou-se novamente o teste de correlação de *Spearman* contudo os valores obtidos foram  $r = 0,287$  e  $p$ -value de 0,196. Estes valores indicam que a correlação entre ambos é fraca e que não é significativa. Isto indica que o Total de Estafilococos é um parâmetro em que os resultados são independentes dos obtidos para os MC a 36 °C, embora ambos sejam indicadores do nível de higiene e cresçam à temperatura de 36 °C.

### **3. Avaliação da qualidade microbiológica do gelo de acordo com o Decreto-Lei n.º 306/2007**

Os critérios definidos pelo DL n.º306/2007, associados aos parâmetros analisados encontram-se expressos na Tabela 2 e que, como já foi mencionado anteriormente, são os requisitos microbiológicos adotados em Portugal para garantir a qualidade do gelo com finalidade de ser consumido pelo Homem.

#### 1ª Fase: Avaliação dos parâmetros mencionados no DL n.º 306/2007 com Valor Paramétrico definido

A 1ª Fase consistiu apenas na verificação da conformidade dos resultados obtidos para os parâmetros mencionados no DL e com Valor Paramétrico (VP) definido, isto é: a amostra não deve apresentar Bactérias Coliformes, *E. coli*, Enterococos Intestinais e *C. perfringens* por 100 mL de amostra.

A frequência de amostras não conformes/impróprias em função do incumprimento de acordo com o DL está apresentada na Tabela 8.

Das amostras analisadas, verifica-se que 25,8% (IC<sub>95</sub> de 9,4% a 42,1%, pelo teste *Mann-Whitney*) obtiveram, em pelo menos um dos parâmetros descritos, um resultado superior ao VP (isto é, diferente de “0”) e como tal foram classificadas como amostras não conformes em relação à qualidade microbiológica.

Esta percentagem, é concordante com a obtida por Mendes (2009), em que 26% das suas amostras foram classificadas como não conformes. Segundo a autora, os resultados obtidos ficaram a dever-se sobretudo à falta de formação dos manipuladores, assim como à inexistência de um sistema HACCP associado às máquinas de produção de gelo. Neste estudo, a presença em simultâneo de “Bactérias Coliformes e Enterococos Intestinais” foi o incumprimento que mais contribuiu para a classificação de não conforme com 37,5 % do total seguido de “Bactérias Coliformes” que foram responsáveis por 25% dos incumprimentos.

#### 2ª Fase: Avaliação dos parâmetros mencionados no DL n.º 306/2007 com Valor Paramétrico definido, incluindo os parâmetros *P. aeruginosa* e Estafilococos C+

Como se pode observar na Tabela 8, analisando os resultados dos parâmetros referidos na 1ª Fase e adicionando os resultados obtidos para os parâmetros *P. aeruginosa* e Estafilococos C+ (ambos, microrganismos potencialmente perigosos e pelo que devem estar ausentes na água destinada ao consumo humano de acordo com alinha a) do 2º

ponto do artigo 8 do Capítulo II do DL n.º306/2007), observa-se que 41,9 % (IC<sub>95</sub> de 23,5 % a 60,3 %, através do teste *Mann-Whitney*) das amostras analisadas não estão a apresentar os requisitos de qualidade exigidos.

A pesquisa destes dois parâmetros adicionais levou a que mais cinco amostras fossem classificadas como não conformes (em comparação com a avaliação efetuada na 1ª Fase), o que corresponde a um incremento de 16,1% de amostras com incumprimento resultante da contaminação inter-humana proveniente da manipulação do gelo. Apesar desse incremento de amostras não conformes aquando da 2ª Fase de avaliação o teste de *Fisher* não mostrou diferenças significativas entre os resultados obtidos entre a 1ª e 2ª Fase (*p-value* = 0,139).

Os incumprimentos com maior percentagem foram: “Bactérias Coliformes e Enterococos” e “*P. aeruginosa*”. Cada incumprimento foi responsável por 23,1% do total de obtido.

O incumprimento “*P. aeruginosa*” mais “Estafilococos C+” foram responsáveis por 38,5% dos incumprimentos detetados nas amostras (correspondendo a cinco das 13 amostras detectadas com incumprimento), valor que é consideravelmente relevante.

A classificação obtida nesta 2ª fase é que vai ser utilizada ao longo da restante apresentação e discussão de resultados, quando se referir a conformidade/qualidade (microbiológica) das amostras de gelo.

Tabela 8 – Frequência das amostras não conformes de acordo com o incumprimento

Incumprimento	1ª Fase	2ª Fase
	Frequência: n (%)	Frequência: n (%)
Bactérias Coliformes	2 (25,0)	2 (15,4)
Bactérias Coliformes, <i>E. coli</i> e Enterococos Intestinais	1 (12,5)	1 (7,7)
Enterococos Intestinais	1 (12,5)	1 (7,7)
Bactérias Coliformes e Enterococos Intestinais	3 (37,5)	3 (23,1)
Enterococos Intestinais e <i>C. perfringens</i>	1 (12,5)	-
Enterococos Intestinais, <i>C. perfringens</i> e Estafilococos C+	-	1 (7,7)
<i>P. aeruginosa</i>	-	3 (23,1)
Estafilococos C+	-	2 (15,4)
<b>Total</b>	<b>8 (25,8)</b>	<b>13 (41,9)</b>

A distinção entre a avaliação da 1ª e 2ª fase consiste no facto de os valores obtidos de *P. aeruginosa* e Estafilococos C+ no primeiro caso não terem sido considerados em termos de conformidade da amostra.

3ª Fase: Avaliação dos parâmetros Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36 °C

Tendo em consideração as orientações do DL n.º 306/2007, o valor dos resultados dos parâmetros MC a 22 °C e a 36 °C não estão diretamente implicados no incumprimento da qualidade da água, uma vez o VP apenas refere “sem alteração anormal”. Para o controlo de qualidade da água, isto significa que os VP devem ser criados com base no histórico, que infelizmente não foi possível obter nem determinar. Contudo, no DL estes dois parâmetros apresentam uma recomendação relativamente aos seus valores que é: “não é desejável que o número de colónias a 22 °C e a 37 °C seja superior a 100 e a 20, respetivamente”.

Tendo em consideração o Valor Recomendado (VR), a Tabela 9 apresenta a frequência dos MC a 22 °C e a 36 °C com resultados superiores ao VR. Verifica-se que o resultado obtido para cada um dos parâmetros de MC obteve 48,4% dos resultados acima do VR.

Tabela 9 – Frequência dos parâmetros Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36 °C com resultados acima do Valor Recomendado

Parâmetro	Frequência: n (%)
MC 22 °C	15 (48,4)
MC 36 °C	15 (48,4)

Na Tabela 10 distribuíram-se as amostras com valores superiores ao VR para os MC a 22 °C, a 36 °C ou ambos em função da sua classificação consoante a sua conformidade para com os restantes parâmetros microbiológicos (Ponto 3 -2ª Fase).

Constatou-se que os 15 valores de cada MC elevados correspondem a uma globalidade de 19 amostras com pelo menos um dos valores de MC superiores ao VR.

Tabela 10 – Distribuição das frequências globais das amostras com resultados de Microrganismos Cultiváveis superiores ao Valor de Referência em função da sua conformidade

Parâmetro	Frequência n (% <sup>1</sup> )	
	Conforme	Não conforme
MC 22°C	3 (9,7)	1 (3,2)
MC 36°C	2 (6,5)	2 (6,5)
Ambos	6 (19,4)	5 (16,1)
<b>Total</b>	11 (25,8)	8 (22,6)

<sup>1</sup> Percentagem em função do número total da população

Observou-se que das 13 amostras que apresentaram resultados não conformes (segundo o Ponto 3 -2ª Fase), oito delas também possuíam MC elevados (num dos parâmetros ou

em ambos) e que das 18 amostras classificadas como conformes, 11 (25,8%) apresentaram resultados de MC superiores ao desejado. Isto significa que 61,1% e 61,5% das amostras classificadas como conformes e não conformes respetivamente, apresentaram pelo menos um dos valores de MC superior ao VR.

#### **4. Avaliação dos resultados em função dos critérios microbiológicos definidos por outras entidades internacionais**

Na Tabela 11 encontra-se descrito a frequência das amostras não conformes tendo por base os critérios estabelecidos para cada uma das entidades mencionadas (ver Tabela 2). Nos critérios estabelecidos é mencionado que a carga microbiana ou MC é determinada à temperatura de 35 °C. No presente estudo o parâmetro analisado que serviu para efectuar a comparação foi o MC a 36 °C. A diferença de um grau é irrelevante e prende-se com diferentes orientações a níveis geográficas e o intervalo de temperatura de MC a 36 °C contempla uma amplitude de trabalho de  $\pm 2$  °C, englobando o valor de 35 °C. Optou-se por avaliar a única amostra de gelo comercial também segundo estes critérios ao invés do avaliar segundo os critérios específicos para gelo produzido industrialmente, já que o gelo amostrado se encontrava num saco que já tinha sido aberto anteriormente de acordo com o procedimento rotineiro do estabelecimento em questão, o que não inviabiliza uma contaminação aquando ou posterior à abertura. Além de que o objetivo deste estudo não se prende com verificar a qualidade do gelo produzido a nível industrial, mas sim a qualidade final desse produto quando servido ao cliente neste tipo de estabelecimentos, independentemente do método de produção.

Contudo, caso classificada como gelo produzido em indústrias próprias para esse fim, essa amostra não cumpria os requisitos estipulados pela FEHD e IPIA para o gelo comercial, devido à contaminação por Bactérias Coliformes. Como já referido anteriormente, este estudo não conseguiu enquadrar temporalmente o momento da contaminação, uma vez que a colheita da amostra só foi efetuada depois do saco de gelo estar aberto e em utilização.

Classificando as amostras segundo os vários critérios fornecidos pelas diferentes entidades, verificou-se que os critérios estabelecidos pela FSAI foram os que levaram a um maior número de amostras com incumprimento. Este valor de incumprimento é igual ao valor obtido pela avaliação segundo o DL n.º306/2007 (Ponto 3-1ª fase,

excluindo a avaliação que contempla os microrganismos *P. aeruginosa* e Estafilococos C+).

Esta equivalência de incumprimentos tem a ver com o facto de esta entidade apresentar também como requisito a pesquisa de Enterococos Intestinais (para além das Bactérias Coliformes e *E. coli*).

Comparando as frequências de amostras não conformes obtidas no presente estudo segundo o referencial da FSAI, a frequência (27,1%) obtida por esta entidade no estudo realizado em 2007, verifica-se que os valores são muito idênticos.

Tabela 11 - Frequência das amostras com incumprimento em função dos critérios estabelecidos por diferentes entidades (excluindo os parâmetros recomendados)

Entidade/Fonte	Âmbito	Frequência: n (%)
FEHD, 2005	Gelo produzido em estabelecimento de alimentação	3 (9,7)
WHO, 2011 <sup>a</sup>	Água para Consumo Humano	6 (19,4)
FSAI, 2007	Gelo	8 (25,8)
Portaria 2.914/2011, Brasil	Água para Consumo Humano	6 (19,4)

## 5. Análise da conformidade das amostras de gelo em função do tipo de estabelecimento e método de produção do gelo

Distribuíram-se as amostras de acordo com a qualidade do gelo apresentada com base na avaliação do ponto 3-2<sup>a</sup> Fase, em função de duas variáveis: tipo de estabelecimento e método de produção do gelo.

A Tabela 12 apresenta a distribuição da conformidade das amostras em função do tipo de estabelecimento.

Analisando a Tabela observou-se que o tipo de estabelecimento que obteve maior percentagem de amostras com classificação não conforme, foi a categoria de Restaurante (53,3%), seguido de Café/Bar/Cafetaria (33,3%) e por último a categoria Hotel (28,6%).

Verificou-se que 25,8% das 31 amostras analisadas apresentaram qualidade microbiológica não conforme e eram provenientes de Restaurantes.

Avaliou-se estatisticamente, se o tipo de estabelecimento estava relacionado com a avaliação efectuada no ponto 3-2<sup>a</sup> Fase e os resultados obtidos através do teste de Fisher vieram mostrar não existirem diferenças significativas entre o tipo de estabelecimento analisado e os resultados microbiológicos obtidos para o gelo ( $p\text{-value} = 0,455$ ).

O facto da menor percentagem de amostras não conformes se encontrar nos estabelecimentos hoteleiros pode dever-se ao facto, como já mencionado anteriormente, de estes serem muitas vezes sujeitos a auditorias internas no âmbito da Segurança Alimentar, existindo já o conhecimento de considerar o gelo como uma fonte de perigos para a segurança alimentar dos utilizadores desse espaço.

Tabela 12 - Distribuição das amostras pelo tipo de estabelecimento em função da qualidade microbiológica do gelo

Tipo de Estabelecimento	n (%)	Frequência				
		Conforme		Não conforme		
		n (%)	% glocal <sup>1</sup>	n (%)	% glocal <sup>1</sup>	% Tipo de estabelecimento <sup>2</sup>
Restaurante	15 (48,4)	7 (38,9)	22,6	8 (61,5)	25,8	53,3
Café/Bar/Cafeteria	9 (24)	6 (33,3)	19,4	3 (23,1)	9,7	33,3
Hotel	7 (22,6)	5 (27,8)	16,1	2 (15,4)	6,5	28,6
Total	31 (100)	18 (100)	58,1	13 (100)	41,9	

<sup>1</sup>Percentagem em função do número total da população; <sup>2</sup>Percentagem em função do tipo de estabelecimento.

A Tabela 13 apresenta a distribuição das amostras segundo o método de produção do gelo. Devido ao reduzido número de análises de gelo comercial ou produzido de uma forma mais doméstica (em sacos e cuvetes) poucas conclusões se conseguem retirar.

Verificou-se que a totalidade das amostras de gelo comercial (uma), assim como o gelo produzido através dos sacos/cuvetes (duas) apresentaram resultados não conformes. Estes valores, em especial os verificados no gelo produzido de forma mais artesanal, já seriam esperados devido às inúmeras possibilidades de contaminação ao longo de todo o seu processo, desde logo pelo facto de se tratar de métodos manuais.

Relativamente ao gelo comercial e pressupondo que se trata de um gelo com qualidade controlada, a contaminação pode advir da contaminação exterior do saco e posterior transferência para o seu interior aquando da sua abertura, degradação/ruptura da embalagem e/ou aquando do manuseamento do gelo por parte dos manipuladores do estabelecimento em questão.

Relativamente às amostras de gelo produzido internamente por máquinas do próprio estabelecimento, verificou-se que 35,7% dessas amostras obtiveram resultados não conformes.

Comparando com os dados obtidos por Mendes (2009), verificou-se que a taxa de estabelecimentos que produzem o gelo por recurso a máquinas é idêntica.

Este método de produção foi responsável, nesse estudo, pelo total de amostras não conformes, não resultando nenhuma amostra não conforme de gelo proveniente de sacos de congelação ou comercial. Em contrapartida no presente estudo todas as amostras de gelo que não foram provenientes de máquina de gelo obtiveram a classificação de amostras não conformes.

O teste de *Fisher* aplicado para verificar a existência de diferenças significativas entre o método usado para produzir o gelo e a avaliação efectuada às amostra de gelo no ponto 3-2ª Fase mostrou não existir relação entre ambas as variáveis ( $p\text{-value} = 0,0636$ ), embora o valor de  $p\text{-value}$  esteja muito próximo do valor (0,05), a partir do qual existe significância entre as variáveis estudadas.

Tabela 13- Distribuição das amostras pelo método de produção de gelo em função da qualidade microbiológica do gelo

		Frequência					
		Conforme			Não conforme		
Método de produção de Gelo		n (%)	n (%)	% glogal <sup>1</sup>	n (%)	% glogal <sup>1</sup>	% Método produção <sup>2</sup>
Interno	Máquina de Gelo	28 (90,3)	18 (100)	58,1	10 (76,9)	32,3	35,7
	Sacos/cuvetes	2 (6,5)	0 (0,0)	0,0	2 (15,4)	6,5	100
Comercial		1 (3,2)	0 (0,0)	0,0	1 (7,7)	3,2	100
<b>Total</b>		31 (100)	18	58,1	13 (100)	41,9	

<sup>1</sup>Percentagem em função do número total da população; <sup>2</sup>Percentagem em função do método de produção.

A Tabela 14 apresenta a distribuição dos incumprimentos detetados em função do método de produção de gelo e do tipo de estabelecimento.

Observou-se que a contaminação por *P. aeruginosa* ocorreu apenas no gelo fabricado pelo próprio estabelecimento por recurso a máquinas e é transversal a todo o tipo de estabelecimentos.

Tanto as Bactérias Coliformes, como os Enterecocos foram detetados em amostras de gelo provenientes de todos os métodos de produção analisados, assim como dos três tipos de estabelecimentos. À excepção das situações enunciadas na Tabela 14 em que

não foram analisadas amostras, a única situação em que não foi detetada nenhuma amostra com Bactérias Coliformes ou Enterococos Intestinais foi nos estabelecimentos de Café/Bar/Pastelaria associada ao método de produção interna com recurso a máquina própria.

Tabela 14 - Distribuição dos tipos de incumprimentos em função do tipo de estabelecimento e do método de produção de gelo

Método de produção		Incumprimento			Total
		Tipo Estabelecimento			
		Restaurante	Café/Bar/Pastelaria	Hotel	
Interno	Máquina de Gelo	BC		BC/ E. coli/	<b>10</b>
		BC	<i>P. aeruginosa</i>		
		BC/Entero		Entero	
		Entero			
	Sacos/cuvete	<i>P. aeruginosa</i>	Estafilococos C+	<i>P. aeruginosa</i>	
		Estafilococos C+			
		Entero/ <i>C.perfringens</i> / Estafilococos C+	BC/Entero	n.a.	<b>2</b>
Comercial		BC/Entero	n.a.	n.a.	<b>1</b>
<b>Total</b>		<b>8</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>13</b>

BC – Bactérias Coliformes; Entero – Enterococos Intestinais n.a. – não aplicável.

## 6. Análise da conformidade dos resultados de Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36 °C, em função do tipo de estabelecimento e método de produção do gelo

Distribuíram-se as amostras tendo como premissa o facto dos resultados se encontrarem de acordo com o VR, em função de duas variáveis: tipo de estabelecimento e método de produção do gelo.

Segundo a Tabela 15, dos 15 resultados superiores ao VR obtidos para os MC a 22 °C e a 36 °C, a categoria Restaurante, em ambos os parâmetros, foi o que mais contribuiu para esses resultados (seis e sete, respetivamente). Noutra perspetiva, das 31 amostras analisadas, 19,4% e 22,6%, foram provenientes de Restaurantes e em simultâneo com valores de MC superiores ao recomendado para o MC a 22C e a 36 °C, respetivamente.

As diferenças descritas anteriormente não são relevantes estatisticamente uma vez que o teste de Fisher mostrou que os resultados/avaliação dos MC a 22 °C ( $p\text{-value} = 0,426$ ) e os MC a 36 °C ( $p\text{-value} = 0,338$ ) não são diferentes estatisticamente quando comparados com o tipo de estabelecimento.

Tabela 15- Distribuição das amostras pelo tipo de estabelecimento em função da conformidade dos valores de Microrganismos a 22 °C e a 36 °C

	Tipo de Estabelecimento	Frequência					
		n (%)	Conforme		Não Conforme		
			n (%)	% (global) <sup>1</sup>	n (%)	% (global) <sup>1</sup>	% tipo estabelecimento <sup>2</sup>
MC 22 °C	Restaurantes	15 (48,4)	9 (56,3)	29	6 (40,0)	19,4	40,0
	Café/Bar/Cafeteria	9 (24,0)	5 (31,3)	16,1	4 (26,7)	12,9	44,4
	Hotel	7 (22,6)	2 (12,5)	6,5	5 (33,3)	16,1	71,4
	<b>Total</b>	31 (100)	16 (100)	51,6	15 (100)	48,4	
MC 36 °C	Restaurantes	15 (48,4)	8 (50,0)	25,8	7 (46,7)	22,6	46,7
	Café/Bar/Cafeteria	9 (24)	6 (37,5)	19,4	3 (20,0)	9,7	33,3
	Hotel	7 (22,6)	2 (12,5)	6,5	5 (33,3)	16,1	71,4
	<b>Total</b>	31 (100)	16 (100)	51,6	15 (100)	48,4	

<sup>1</sup>Porcentagem em função do número total da população; <sup>2</sup>Porcentagem em função do tipo de estabelecimento.

A Tabela 16 apresenta a distribuição das amostras segundo o método de produção de gelo. Analisando a Tabela constatou-se que a amostra de gelo comercial apenas apresentou os MC a 36 °C superior ao VP, o que é indicativo de contaminação de origem humana (apenas).

Cerca 50% das amostras de gelo, produzido internamente com a própria máquina, apresentaram valores de MC a 22 °C e a 36 °C superiores ao VR.

Tabela 16 - Distribuição das amostras pelo método de produção de gelo em função da conformidade dos valores de Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36 °C

	Método de Produção do Gelo	Frequência					
		n (%)	Conforme		Não Conforme		
			n (%)	% (global) <sup>1</sup>	n (%)	% (global) <sup>1</sup>	% Método Produção <sup>2</sup>
22 °C	Interno Máquina de Gelo	28 (90,3)	14 (87,5)	45,2	14 (93,3)	45,2	50,0
	Sacos/ Cuvetes	2 (6,5)	1 (6,25)	3,2	1 (6,7)	3,2	50,0
	Comercial	1 (3,2)	1 (3,2)	3,2	0,0	0,0	0,0
	<b>Total</b>	31 (100)	31 (100)	51,6	15 (100)	48,4	
36 °C	Interno Máquina de Gelo	28 (90,3)	15 (93,75)	48,4	13 (86,6)	41,9	46,4
	Sacos/ Cuvetes	2 (6,5)	1 (6,25)	3,2	1 (6,7)	3,2	50,0
	Comercial	1 (3,2)	0 (0,0)	0,0	1 (6,7)	3,2	100
	<b>Total</b>	31 (100)	16 (100)	51,6	15 (100)	48,4	

<sup>1</sup>Porcentagem em função do número total da população; <sup>2</sup>Porcentagem em função do método de produção.

Estes dados não apresentam diferenças significativas entre o método de produção de gelo e avaliação efectuada aos valores obtidos para os MC a 22 °C e a 36 °C uma vez que os valores obtidos de *p-value*, através do teste de *Fisher* foram muito elevados (22 °C: *p-value* = 1, valor indicativo da não existência total de alguma relação e a 36 °C: *p-value* = 0,733).

## **7. Análise dos parâmetros de campo: Cloro e pH**

No Anexo 9 foram compilados todos os valores registados de Cloro e pH, obtidos durante o presente estudo. Os dados estatísticos determinados a partir dos resultados obtidos para cada um dos parâmetros encontram-se mencionados na Tabela 17.

De realçar que a determinação do cloro total teve como objetivo verificar a existência de cloro noutra forma que não na forma livre/residual. O valor de cloro total resulta do somatório do cloro residual com o cloro combinado. O cloro residual é o cloro que se encontra disponível/livre (após tratamento da água) para combater as eventuais futuras contaminações (Administração Regional de Saúde do Norte, IP (ARSN), s.d.). O cloro combinado é o cloro que se encontra ligado a outros compostos químicos contudo e à medida que o cloro residual é consumido, a concentração deste vai baixar e fazer com que o equilíbrio químico se desloque no sentido de produzir mais cloro residual/livre.

Os resultados expressos no Anexo 9 mostram a existência um número considerável de amostras em que o cloro total é idêntico ao cloro residual, tanto para amostras de águas como de gelo. Em contrapartida a média/mediana do cloro total foi aproximadamente duas vezes superior ao valor da média/mediana do cloro residual para ambos os tipos de amostra.

Verificou-se que ao nível da água que abastece o estabelecimento, o cloro residual obteve uma amplitude de resultados entre 0,00 e 0,74 mg L<sup>-1</sup> e uma média de 0,27 mg L<sup>-1</sup>, o pH variou entre 7,10 e 7,98 e a média foi de 7,59.

No gelo, os resultados obtidos para o cloro residual mostraram uma amplitude de resultados entre 0,00 e 0,38 mg L<sup>-1</sup> e uma média de 0,09 mg L<sup>-1</sup>. O pH variou entre 6,55 e 8,23 e obteve uma média de 7,40.

Gerokomou et al. (2011), no estudo que desenvolveu em amostras de gelo obteve resultados de pH com amplitudes de 7,2 a 8,3 e média de 7,7, resultados estes que apresentam semelhanças com os obtidos neste estudo. Comparando os resultados para o cloro residual obtidos a partir da água que abastece o estabelecimento e do gelo,

verificou-se que os valores dos parâmetros: máximo, média e mediana são inferiores em amostras de gelo.

Excluindo os resultados associados ao gelo produzido comercialmente pois não se conhecia o valor destas variáveis na água usada para produzir o gelo, os testes mostraram não existirem diferenças significativas entre os valores obtidos para o cloro total na água de abastecimento e no gelo (teste de *Fisher*: *p-value* = 0,086) e no cloro residual na água de abastecimento e no gelo (teste de *Fisher*: *p-value*: 0,224).

Tabela 17 - Resumo estatístico dos valores obtidos para os parâmetros de campo

		Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão
Água	Cloro Total (mg L <sup>-1</sup> )	0,01	0,90	0,48	0,47	0,28
	Cloro Residual (mg L <sup>-1</sup> )	0,00	0,74	0,27	0,24	0,23
	pH	7,1	7,98	7,59	7,6	0,21
Gelo	Cloro Total (mg L <sup>-1</sup> )	0,00	0,66	0,23	0,15	0,1
	Cloro Residual (mg L <sup>-1</sup> )	0,00	0,38	0,09	0,08	0,47
	pH	6,55	8,23	7,4	7,52	0,19

#### Análise dos resultados de acordo com os Valores Paramétricos definidos pelo DL n.º 306/2007.

A Tabela 18 apresenta a frequência de resultados segundo a conformidade dos valores determinados para o cloro residual e pH na água de abastecimento e no gelo em função do VP definido pelo DL n.º 306/2007. Salienta-se que os dados do gelo apenas reportam resultados referentes a 30 amostras, visto que, uma das amostras analisadas era proveniente de gelo comercial, sendo desconhecido o valor do desinfetante da água usada para produzir esse gelo, impossibilitando a comparação.

Nas amostras de água de abastecimento, observou-se que 19 das 31 (61,3%) amostras colhidas apresentaram valores de cloro residual fora do intervalo exigido. Desses 19 resultados, 4 obtiveram resultados superiores a 0,6 mg L<sup>-1</sup> e as restantes 15 obtiveram valores inferiores a 0,2 mg L<sup>-1</sup>. No gelo constatou-se que 27 das 30 (86,7%) amostras apresentaram valores que não se enquadravam no intervalo exigido e todos esses resultados foram inferiores a 0,2 mg L<sup>-1</sup>.

Estes valores de cloro residual fora dos VP são preocupantes (em especial os valores referentes à água de abastecimento), uma vez que o sistema de abastecimento utilizado por todos os estabelecimentos era um abastecimento público e o DL n.º 306/2007 instituiu a obrigatoriedade da desinfecção como processo de tratamento da água, processo esse que deverá ter um controlo operacional adequado de forma a garantir uma

água microbiologicamente própria para consumo Humano ao longo de toda a rede de abastecimento (Recomendação IRAR n.º5, 2007).

Os valores de cloro residual superiores aos definidos não apresentam uma diferença mínima em comparação com o valor limite superior. Realça-se contudo que, o cloro em concentrações superiores ao estipulado pode ser responsável pela produção de subprodutos, dos quais se destacam os trihalometanos (produtos cancerígenos), além de adicionar cheiro e sabor à água (ARSA, 2012a; ARSN, s.d.).

Comparando a percentagem de resultados de cloro residual fora do VP na água de abastecimento e no gelo verifica-se que o gelo obteve 25,6% mais amostras com valores fora do intervalo desejado. Também a média obtida (cloro residual) para o gelo foi inferior à da água. Esta diferença pode estar associada ao facto de a concentração de cloro residual ir diminuindo ao longo do processo de produção e conservação de gelo, partindo do princípio que a concentração de cloro doseado na água era a mesma que abasteceu a máquina para produção do gelo analisado.

Ao nível do parâmetro pH verificou-se que todas as amostras (água e gelo) apresentaram um pH que se situou entre 6,5 e 9,0.

Tabela 18- Avaliação/Conformidade dos valores obtidos para o cloro residual e pH em amostras de água de abastecimento e no gelo (produzido pelos próprios estabelecimentos) de acordo com o definido pelo Decreto- Lei n.º 306/2007

		VP	Total (n)	Frequência (n (%))	
				Conforme	Não conforme
Água	Cloro residual (mg L <sup>-1</sup> )	0,2 a 0,6	31	12 (38,7)	19 (61,3)
	pH	6,5 a 9,0	31	31 (100,0)	0 (0,0)
Gelo	Cloro residual (mg L <sup>-1</sup> )	0,2 a 0,6	30	3 (10,0)	27 (90,0)
	pH	6,5 a 9,0	30	30 (100,0)	0 (0,0)

#### Relação entre a conformidade dos valores de cloro na água de abastecimento e no gelo em função da qualidade microbiológica do gelo

A Tabela 19 apresenta a frequência das amostras segundo a conformidade dos valores de cloro residual na água de abastecimento e no gelo em função da avaliação microbiológica das amostras de gelo (Ponto 3-2ª Fase).

Salienta-se que das 11 amostras com valor de cloro residual conforme na água de abastecimento, quatro correspondem a amostras de gelo que não se encontravam conformes microbiologicamente. Verifica-se também que das amostras com valor de

cloro residual abaixo do VP (15) apenas 40% das amostras de gelo obtiveram resultados não conformes. E por último, das quatro amostras com valores de cloro residual superior ao definido, 50% apresentaram amostras de gelo não conformes.

Teoricamente seria de esperar que a percentagem de amostras de gelo contaminadas fosse inferior para as amostras de água com valores de cloro superior a  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ . Contudo o que se verificou foi que 50% das amostras não conformes estavam associadas a amostras de água com concentração de cloro residual superior a  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ . Os resultados obtidos mostraram, pelo teste de *Fisher*, não serem significativos ( $p\text{-value} = 1$ ). Pelo valor obtido para o  $p\text{-value}$  o cloro da água não tem influência nenhuma sobre a qualidade do gelo. Tal facto, pode estar associada aos diferentes níveis/carga de contaminação entre amostras e também por não ser possível garantir que a concentração de cloro na água doseada seria a mesma que a da água usada para a produção de gelo.

Relativamente aos valores determinados no gelo, destaca-se que em 40,7% do total das amostras, o valor de cloro residual encontra-se abaixo do VP e simultaneamente obtiveram gelo com qualidade não conforme. Através dos dados obtidos e utilizando o teste de *Fisher*, verificou-se (e ao contrário do que seria de esperar) que o cloro residual no gelo não tem influência nenhuma sobre a qualidade microbiológica do gelo ( $p\text{-value} = 1$ ).

Tabela 19 – Frequência das amostras de acordo com a conformidade do valor do cloro residual (água de abastecimento e gelo) em função da qualidade microbiológica do gelo

Cloro Residual	Qualidade Microbiológica do Gelo (n (%))			
	Conforme	Não conforme	Total	
Água	Conforme	7 (63,6)	4 (36,4)	11 (36,7)
	Não Conforme (<VP)	9 (60,0)	6 (40,0)	15 (50,0)
	Não conforme (>VP)	2 (50,0)	2 (50,0)	4 (13,3)
	Total	18 (60,0)	12 (40,0)	30 (100)
Gelo	Conforme	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (10,0)
	Não Conforme (<VP)	16 (59,3)	11 (40,7)	27 (90,0)
	Total	18 (60,0)	12 (40,0)	30 (100)

Não foi contemplado a amostra referente ao gelo comercial

### Relação entre a conformidade dos valores de cloro em função da avaliação dos valores de MC

A Tabela 20 apresenta a frequência das amostras segundo a conformidade dos valores de cloro residual na água de abastecimento e no gelo em função da conformidade dos valores de MC a  $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e/ou a  $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$  obtidos nas amostras de gelo correspondentes.

Avaliação da conformidade dos MC teve por base uma avaliação global dos dois parâmetros, isto é, bastou um parâmetro de MC se encontrar superior ao VR para a amostra ser classificada como não conforme.

Na água de abastecimento observou-se ainda que das 11 amostras com valores de cloro residual dentro do intervalo estabelecido, 45,5% apresentaram valores de MC superiores ao desejado. Relativamente às 15 amostras com valores de cloro inferiores ao pretendido verificou-se que 66,7% das amostras de gelo associadas obtiveram valores de MC numa carga inaceitável. Paralelamente ao que aconteceu anteriormente aquando da avaliação dos valores de cloro residual na água de abastecimento em função dos restantes parâmetros microbiológicos, a maior percentagem de valores inaceitáveis de MC também se encontra em valores de cloro residual superior ao pretendido.

Relativamente ao gelo, constatou-se que das três amostras com valores de cloro aceitáveis, duas apresentaram valores de MC elevados e que das 27 amostras com valores de cloro abaixo do definido, 11 (40,7%) obtiveram valores de MC aceitáveis.

Tabela 20 - Frequência das amostras de acordo com a conformidade do valor do cloro residual (água de abastecimento e gelo) em função da conformidade dos valores de Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36 °C

Cloro Residual	MC (22 °C e/ou 36 °C) (n (%))			
	Conforme	Não Conforme	Total	
Água	Conforme	6 (54,5)	5 (45,5)	11 (36,7)
	Não Conforme (<VP)	5 (33,3)	10 (66,7)	15 (50,0)
	Não conforme (>VP)	1 (25,0)	3 (75,0)	4 (13,3)
	Total	12 (40,0)	18 (60,0)	30 (100)
Gelo	Conforme	1 (33,3)	2 (66,7)	3 (10,0)
	Não Conforme (<VP)	11 (40,7)	16 (59,3)	27 (90,0)
	Total	12 (40,0)	18 (60,0)	30 (100)

Não foi contemplado a amostra referente ao gelo comercial

Em 1973 ocorreu um surto de grandes dimensões por *Shigella flexneri* num cruzeiro atribuído a água e gelo. As investigações efetuadas concluíram que o tanque reservatório de água foi contaminado no processo de carregamento de água por água do mar do sistema de incêndio e o sistema de cloração revelou-se inadequado para desinfetar a água contaminada, o que reforça a ideia da importância de um correto nível de cloro residual de modo a garantir a segurança alimentar do gelo para consumo humano (WHO, 2001).

Correlação entre os valores de cloro residual obtido para a água de abastecimento e no gelo em relação aos valores obtidos para os todos os parâmetros microbiológicos

Com a verificação da existência de relação entre os resultados obtidos de cloro residual e os parâmetros microbiológicos tentou-se verificar/reforçar a importância da quantidade do cloro na redução da carga microbiana.

Nesse sentido aplicou-se o teste de correlação de *Spearman* em relação ao cloro residual da água de abastecimento e a cada um dos parâmetros microbiológicos, e posteriormente efetuou-se o mesmo teste mas desta vez utilizando os valores de cloro residual determinados no gelo em função dos parâmetros microbiológicos. Não foram utilizados os valores obtidos para a amostra de gelo comercial pelas razões anteriormente já apresentadas.

Os valores de *r* e *p-value* obtidos para cada uma das situações estudadas encontram-se mencionados na Tabela 21. Na grande generalidade, as correlações estudadas não foram significativas, à exceção do “cloro residual da água entre os MC a 22 °C” e “cloro residual da água e os MC a 36 °C”. Em ambos os estudos o valor de *r* foi -0,402, valor este que indica uma relação negativa fraca ou não perfeita.

Tabela 21- Valores obtidos através do teste de correlação *Spearman* (*r* e *p-value*) entre e o valor de cloro residual (água e gelo) e os resultados dos parâmetros microbiológicos

Parâmetro Microbiológico	Cloro residual			
	Água		Gelo	
	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
MC 22 °C	-0,402	0,027	-0,054	0,776
MC 36 °C	-0,402	0,028	0,034	0,859
Bact. Coliformes	-0,133	0,485	0,152	0,423
<i>E. coli</i>	0,011	0,955	0,313	0,092
Enterococos Intestinais	-0,320	0,085	0,225	0,233
<i>C. perfringens</i>	-0,290	0,120	0,151	0,425
<i>P. aeruginosa</i>	0,177	0,348	-0,089	0,641
Estafilococos C+	-0,046	0,810	0,016	0,933
Total de Estafilococos	-0,262	0,163	-0,067	0,724

Como já foi mencionado anteriormente, o cloro é um agente desinfetante, teoricamente em amostras com concentração mais elevadas desta substância, os valores microbiológicos deviam ser mais baixos. O facto de apenas em duas situações ter sido possível obter resultados significativos pode dever-se a estes dois parâmetros terem

obtido uma frequência de resultados positivos próximos de 100%, ao contrário dos restantes. O facto de não existir nenhuma correlação significativa associada ao cloro residual do gelo pode dever-se ao maior número de resultados nulos no gelo em comparação com a água de abastecimento.

## **8. Análise dos questionários/fichas de campo**

Este estudo foi desenvolvido no âmbito de um estudo piloto criado para o programa de vigilância de águas para consumo humano com o intuito de obter informações acerca da qualidade microbiológica do gelo utilizado para consumo humano.

### 8.1. Avaliação dos requisitos gerais de caracterização dos estabelecimentos

As respostas aos inquéritos desenvolvidos sobre a caracterização dos estabelecimentos ao nível dos requisitos implementados mostraram que a quase totalidade dos estabelecimentos se encontrava em conformidade com todos os requisitos investigados (seis dos 10 itens avaliados apresentaram 100 % de conformidade). O item que obteve menor percentagem (embora elevada) de conformidade foi o item “Contentores de resíduos com tampa accionada por pedal e revestido com sacos de plástico” com 90,3%. A marcha em frente da copa ou cozinha foi evidenciada em todos as situações, à excepção de oito estabelecimentos em que não foi possível obter esta informação devido ao facto de a copa ou a cozinha se situarem em divisórias distintas do local do gelo, principalmente ao nível de Hotéis e também não existir muita abertura por parte dos responsáveis para verificar tal conformidade. Das amostras colhidas nestes oito estabelecimentos, duas foram classificadas como não conformes microbiologicamente. As únicas situações em que os itens referidos na Tabela 22, não se encontram em conformidade e estavam associados as amostras de gelo classificadas como não conformes foram:

- um estabelecimento com ausência de equipamento para eliminação de insectos, em que a amostra estava contaminada por Bactérias Coliformes e Enterococos Intestinais
- dois estabelecimentos que não evidenciaram “Contentores de resíduos com tampa accionada por pedal e revestido com sacos de plástico” apresentaram as suas amostras contaminadas por Enterococos Intestinais, *C. perfringens* e Estafilococos C+ e outra por Bactérias Coliformes e Enterococos Intestinais

Tabela 22 – Frequência de conformidade dos vários requisitos analisados em função da qualidade das amostras de gelo associadas e classificadas como não conformes

Item /Conceito	Frequência (n (%))			
	Sim		Não	
	Qualidade Microbiológica do Gelo			
	Conforme	Não Conforme	Conforme	Não Conforme
1. Existência de Sistema HACCP e/ou Boas Práticas de higiene e fabrico	18 (58,1)	13 (41,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
2. Condições gerais do estabelecimento aceitáveis (limpo, organizado, material em bom estado, entre outros)	17 (54,8)	13 (41,9)	1 (3,2)	0 (0,0)
3. Conceito de marcha em frente do espaço de copa/cozinha	20 (64,5)	11 (35,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
4. Programa de limpeza e desinfeção das instalações e equipamentos	18 (58,1)	13 (41,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
5. Programa de prevenção/controlo de pragas	18 (58,1)	13 (41,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
6. Equipamento para eliminação de insectos	16 (51,6)	12 (38,7)	2 (6,5)	1 (3,2)
7. Contentores de resíduos com tampa accionada por pedal e revestido com sacos de plástico	18 (58,1)	11 (35,5)	0 (0,0)	2 (6,5)
8. Pessoal/Manipuladores tem formação básica em Higiene e Segurança Alimentar	18 (58,1)	13 (41,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
9. Instalações sanitárias/vestiários devidamente separados das zonas de laboração, com correta ventilação e manutenção	17 (54,8)	13 (41,9)	1 (3,2)	0 (0,0)
10. Serviços de Higiene e Segurança no Trabalho	18 (58,1)	13 (41,9)	0 (0,0)	0 (0,0)

### 8.2. Verificação de boas práticas de produção e manuseamento de gelo

A segunda parte do inquérito teve como objectivo verificar, mas acima de tudo caracterizar, numa perspectiva de segurança alimentar, a forma como estava a ser produzido o gelo (caso se aplicasse), assim como o modo de manuseamento e relaciona-los com a qualidade do gelo analisado.

#### Caracterização da máquina de produção de gelo (alíneas do item 4)

A população associada a este item foi apenas de 27, uma vez que foi este o número de estabelecimentos em que o gelo era produzido por máquinas e que se teve acesso à máquina de modo a ser possível preencher os referidos itens. Estas 27 amostras correspondem a um total de nove amostras não conformes.

A Tabela 23 apresenta as características das máquinas de produção de gelo em função da avaliação da qualidade microbiológica do gelo.

Em todas as situações as máquinas apresentavam o reservatório de água e o compartimento de armazenamento de gelo isolados, ligação ao esgoto e a porta do equipamento encontrava-se fechada. À exceção de uma situação (associado a amostra de gelo não conforme) em que a máquina não tinha nenhuma válvula de retenção (alimentação e esgoto), todas as restantes apresentavam essa peça. A válvula de esgoto impede o retorno da água do esgoto impedindo que entre novamente na máquina, contaminando-a. Por sua vez, o facto de não existir válvula ao nível da alimentação, permite que, em caso de contaminação da máquina e retorno do caudal, esta contaminação se propague à rede predial. A inexistência das válvulas de retorno, em especial a do esgoto já foi associada a um surto de doenças com origem no gelo descrito por Khan et al., em 1994.

Tabela 23 – Caracterização das máquinas de produção de gelo em função da conformidade das amostras de gelo

Características da máquina	Frequência (n (%))			
	Sim		Não	
	Qualidade Microbiológica do Gelo			
	Conforme	Não Conforme	Conforme	Não Conforme
4.4. Válvula de retorno de água na entrada de alimentação	18(66,7)	8 (29,6)	0 (0,0)	1 (3,7)
4.5. Reservatório de água e compartimento de gelo isolados	18 (66,7)	9 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
4.6. Máquina ligada ao esgoto	18 (66,7)	8 (29,6)	0 (0,0)	1 (3,7)
4.6.1 Válvula de retorno	18(66,7)	8 (29,6)	0 (0,0)	1 (3,7)
4,7 Diferentes compartimentos limpos	16 (66,7)	9 (25,9)	2 (7,4)	0 (0,0)
4.8 Porta da máquina fechada	18 (66,7)	9 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)

#### Localização da máquina de produção de gelo (item 4.9)

A Tabela 24 apresenta a frequência das amostras de acordo com a localização da máquina de produção de gelo e a sua conformidade microbiológica.

Verificou-se que a quase totalidade das máquinas se situam no balcão (64,3%) e copa (32,1%) (preferencialmente na zona dos limpos). A única amostra que não se situava nestes dois locais, encontrava-se noutras instalações do estabelecimento, mas independentes das visitadas e a amostra de gelo não se encontrava conforme.

Das 18 máquinas situadas na zona do balcão, seis apresentaram amostras de gelo não conformes enquanto, das nove localizadas na copa, apenas três revelaram as amostras

colhidas não conformes. Conclui-se assim que a zona do balcão, foi o local onde se obteve uma maior percentagem de amostras não conformes.

Aplicou-se teste estatístico de *Fisher* para verificar a se a localização da máquina tinha influência na avaliação microbiológica do gelo. O valor obtido para *p-value* para o referido teste foi de 0,615, o que significa que os resultados não são significativos e como tal, a localização da máquina não tem influência da avaliação das amostras de gelo, contudo o valor de *p-value* é muito próximo do valor a partir do qual se considera existirem diferenças significativas.

Tabela 24- Distribuição das amostras de acordo com a localização da máquina produção de gelo e a sua conformidade microbiológica

Localização da Máquina	Frequência (n(%))		
	Total	Conformes	Não Conformes
Balcão	18 (64,3)	12 (42,9)	6 (21,4)
Copa	9 (32,1)	6 (21,4)	3 (10,7)
Outros	1 (3,6)	0 (0,0)	1 (3,6)
Total	28 (100)	18 (64,3)	10 (35,7)

#### Plano de limpeza e higienização (4.10)

A existência de plano de limpeza e higienização tal como é conhecido (contemplando os itens, periodicidade, detergentes usados e o modo de executar o procedimento) apenas foi observado em 10 situações. A Tabela 25 distribui a frequência de amostras de gelo de acordo com a sua conformidade microbiológica em função da existência de plano de limpeza e higienização. Das 17 máquinas que não tinham plano de limpeza e higienização associados, seis obtiveram resultados não conformes na avaliação da qualidade do gelo.

Aplicou-se o teste de *Fisher* (*p-value* = 1) que mostrou não existir nenhuma significância entre a existência de plano de limpeza e higienização e a avaliação microbiológica do gelo.

Tabela 25 – Distribuição das amostras de acordo com a existência de plano de limpeza e higienização da máquina de produção de gelo e a sua conformidade microbiológica

Plano de Limpeza	Frequência (n)		
	Total	Conforme	Não Conforme
Sim	10	7	3
Não	17	11	6

#### Periodicidade de execução do plano de limpeza (item 4.11)

Apesar de grande parte não possuir o referido plano de limpeza e higienização, alguns dos estabelecimentos apresentaram alguns dados, associados aos planos de limpeza e higienização e que foram considerados relevantes para o presente estudo (sendo essa informação obtida através da conversa com os colaboradores/manipuladores dos estabelecimentos, não existindo evidências das mesmas).

A Figura 13 apresenta a distribuição das amostras de acordo com a sua conformidade em função da periodicidade de execução do plano de limpeza e higienização em função da sua conformidade com o DL n.º 306/2007. De referir que das 27 amostras, quatro não tinham definido a periodicidade de execução do plano e que a periodicidade que apresenta maior frequência é a semanal. Foi ao nível da periodicidade semanal e “não definido” que se obteve maior número de amostras de gelo não conformes (três em cada categoria).

A periodicidade de limpeza não apresentou resultados significativos em relação à avaliação do gelo (teste de Fisher:  $p\text{-value} = 0,130$ ).

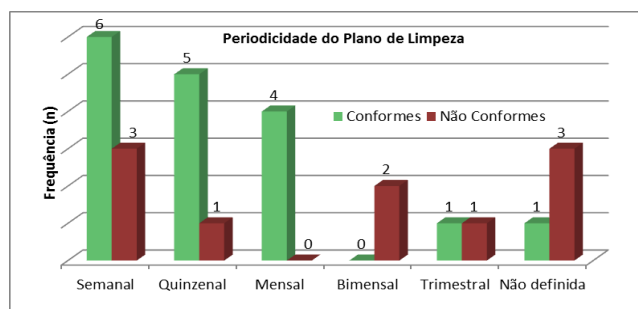


Figura 13 - Periodicidade da execução do plano de limpeza e higienização da máquina em função da qualidade microbiológica do gelo

#### Número de dias entre a última limpeza e a data da colheita de gelo (item 4.12)

A Figura 14 (item 4.12) apresenta as frequências das amostras de gelo de acordo com a sua conformidade em função do número de dias que passou desde a última limpeza e higienização da máquina até à data da realização da visita e colheita.

De referir que em quatro situações, o prazo de execução do plano já tinha sido ultrapassado. Verificou-se que foi entre o 16º e o 30º dia, onde se encontrou a maior frequência de amostras (10 em 27). Salienta-se o facto de cinco amostras não apresentarem registos/evidências da data da última realização do plano de limpeza e higienização da máquina de produção de gelo.

O número de dias entre a última limpeza e a colheita de gelo não apresentou resultados significativos sobre a qualidade do gelo (teste de Fisher:  $p\text{-value} = 0,108$ ).

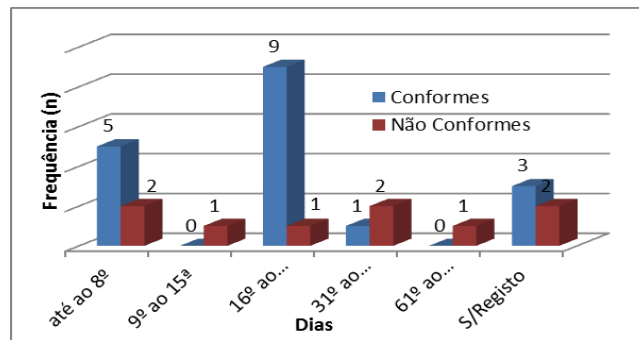


Figura 14 - Distribuição das amostras pelo tempo decorrido entre a última execução do plano de limpeza e higienização da máquina em função da qualidade microbiológica do gelo

De referir que é essencial evitar a formação de biofilmes no interior da máquina, o que tornará mais difícil garantir a eficácia do processo de higienização e eliminação de patogénicos, já que os biofilmes são difíceis de remover. A formação de biofilmes apenas se consegue pelo respeito dos planos de higienização adequados (Powitz, 2013).

#### Programa de manutenção preventiva da máquina (item 4,14)

No item relacionado com a existência de um programa de manutenção preventiva da máquina verificou-se que apenas três das 27 máquinas tinham este programa associado ao seu funcionamento. A existência destes programas foi verificada apenas para os estabelecimentos de Café/Bar/Cafetaria e as amostras colhidas nestas três situações foram todas classificadas como conformes segundo os critérios microbiológicos do DL n.º 306/2007.

#### Procedimento/Regra escrito implementado sobre cuidados a ter na manipulação do gelo (Item 5)

Verificou-se que 100% dos estabelecimentos não possuía nenhum tipo de procedimento implementado sobre a correcta manipulação do gelo.

#### Conservação do gelo (item 6)

Verificou-se que a totalidade dos estabelecimentos que utilizam máquina para produção de gelo e esta se encontra nas próprias instalações do estabelecimento (27 no total),

fornecem gelo aos clientes a partir do compartimento de armazenamento do gelo da própria máquina.

Das restantes quatro situações, três delas estão associadas aos casos em que o gelo é comercial ou produzido no estabelecimento mas não recorrendo a máquinas (utilizando os já referidos sacos de gelo e cuvetes). Nestes casos o gelo é transferido do recipiente onde é fornecido ou produzido, para o balde, sendo posteriormente fornecido ao cliente a partir destes baldes.

A outra situação trata-se de um Restaurante (já referido anteriormente) em que o gelo é produzido noutra local. Neste caso o gelo é transportado, do local onde foi produzido para o estabelecimento através de sacos e por ultimo é transferido para os baldes, de onde será facultado aos clientes. Nesta situação, em específico, existem muitos fatores de risco associados, tais como: a transferência do gelo da máquina para os sacos (que são de uma dimensão considerável, o que aumenta a probabilidade de contaminação, nem que seja ambiental), o transporte do gelo até ao estabelecimento (em carros refrigerados e específicos para este tipo de produtos, de modo a evitar perfuração dos sacos, contaminação do exterior dos sacos, que posteriormente poderá contaminar o produto, aquando da sua abertura, e por ultimo, e não menos importante, o descongelar da amostra).

De referir que as quatro situações em que o gelo não é conservada exclusivamente nas máquinas, todas estavam associadas a amostras não conformes.

#### Equipamento de conservação do gelo imediatamente antes da sua utilização (item 6.2)

A Tabela 26 apresenta a frequência das amostras de acordo com a conformidade microbiológica em função do equipamento de conservação do gelo imediatamente antes de ser servido ao cliente, realçando-se o facto de 33,3% das amostras conservadas nas máquinas se encontrarem contaminadas, assim como as quatro amostras que se encontravam conservadas no balde de gelo.

Tabela 26 - Distribuição das amostras de acordo com a local de conservação do gelo e a sua conformidade microbiológica de acordo com o Decreto-Lei n.º306/2007

Equipamento de Conservação	Frequência		
	Total	Conforme	Não Conforme
Máquina	27 (87,1)	18 (66,7)	9 (33,3)
Balde de gelo	4 (12,9)	0 (0,0)	4 (100)
Total	31 (100)	18 (58,1)	13 (41,9)

Testou-se os resultados obtidos estatisticamente e verificou-se que os dados obtidos são significativos, isto é, o local de conservação do gelo influencia a avaliação/qualidade do gelo (teste de *Fisher*:  $p\text{-value} = 0,023$ ).

#### Registo e controlo de temperatura dos equipamentos de conservação do gelo (item 7)

100% dos estabelecimentos não tinham implementado um sistema de controlo e registo de temperaturas, associado aos equipamentos de conservação do gelo.

#### Utensílio usado para manuseamento do gelo (Item 8)

Com as respostas a este item verificou-se que a globalidade dos estabelecimentos (96,8%) utiliza a pá/pinça para proceder à transferência/manuseamento do gelo. A exceção foi um estabelecimento que utilizou um copo de plástico para executar essa transferência. O copo de plástico de uma forma geral poderia indicar uma maior probabilidade de a amostra transferida se encontrar contaminada, contudo neste caso tal não foi observado. O copo apresentava superfície lisa e encontrava-se em bom estado de conservação como referido em pelo Regulamento n.º 852/2004, de modo a reduzir o risco de contaminação.

Como seria de esperar, dado o reduzido número em que o utensílio usado não foi a pá/pinça, o tipo de utensílio usado para manusear o gelo não apresenta significância alguma (teste de *Fisher*:  $p\text{-value} = 1$ ) em relação à avaliação microbiológica.

#### Local onde é guardado o utensílio usado para manusear o gelo (item 9)

A Tabela 27 apresenta a distribuição das amostras de gelo de acordo com a sua conformidade em função dos vários locais onde são guardados os utensílios usados para manusear o gelo. Verificou-se que independentemente dos locais definidos para guardar o utensílio existem amostras contaminadas. A exceção foi um caso em que não existia um local definido e em que amostra não apresentou contaminação. Relativamente a este item as respostas à “Ficha de Caracterização de Campo” vieram demonstrar que grande parte dos utensílios é guardada no interior da máquina (20 das 27, lembrando que apenas 27 amostras do nosso universo foram produzidas por máquinas no interior do próprio estabelecimento).

Observou-se ainda que quando o utensílio é guardado no recipiente, no balde de gelo ou em cima do balcão (sem proteção), todas as amostras associadas se apresentaram

contaminadas. Estatisticamente o teste *Fisher* confirmou que os resultados não são significativos, embora o valor (*p-value* 0,056) seja muito próximo do valor de 0,05.

Tabela 27- Distribuição das amostras pelo local onde é guardado o utensílio para fornecer o gelo e a conformidade microbiológica do gelo

Local onde é guardado o utensílio	Frequência (n(%))		
	Total	Conforme	Não Conforme
Interior da Máquina	20 (64,5)	14 (70)	6 (30)
Recipiente com água	3 (9,7)	2 (66,7)	1 (33,3)
Balde de gelo	3 (9,7)	0 (0,0)	3 (100)
Cima do Balcão	2 (6,5)	0 (0,0)	2 (100)
Armário de Talheres	2 (6,5)	1 (50,0)	1 (50)
Não Definido	1 (3,2)	1 (100)	0 (0)
Total	31 (100)	18 (58,1)	13 (41,9)

Ressalta-se que muitos dos surtos associados ao consumo de gelo são devidos à presença de vírus Norwalk por más práticas higiénicas de manipulação, pelo que é fundamental o respeito total pelas boas práticas de higiene e manipulação (Constable, 2013).

#### Periodicidade de limpeza e higienização do utensílio usado para manusear o gelo (Item 10)

A Tabela 28 apresenta a frequência das amostras de gelo de acordo com sua conformidade em função da periodicidade com que se realiza a limpeza e higienização do utensílio usado para transferir o gelo.

Tabela 28 - Distribuição da periodicidade com que se realiza a limpeza e higienização do utensílio usado para fornecer o gelo ao cliente em função da sua conformidade microbiológicos do gelo

Periodicidade de limpeza do utensílio	Frequência (n (%))		
	Total	Conforme	Não Conforme
Cada utilização	2 (6,5)	2 (100)	0 (0,0)
Diária	21 (67,7)	12 (57,1)	9 (42,9)
Semanal	2 (6,5)	0 (0,0)	2 (100)
Não Definido	6 (19,4)	4 (66,7)	2 (33,3)
Total	31 (100)	18 (58,1)	13 (41,9)

À medida que a periodicidade aumenta a percentagens de incumprimentos também aumenta, sendo que a periodicidade “diária” não obteve nenhuma amostra contaminada, ao invés da “semanal” que obteve a totalidade das suas amostras contaminadas (n=2).

De referir ainda que seis das 31 amostras não apresentaram periodicidade definida.

Aplicou-se o teste de *Fisher* para confirmar se os resultados eram significativos, contudo o valor de *p-value* (0,321) mostrou que não, logo a avaliação da qualidade do gelo é independente da periodicidade de limpeza do utensílio usado para fornecer o gelo aos clientes.

#### Lavatórios exclusivos para funcionários localizados perto da máquina/balde do gelo (item 11)

Verificou-se que 90,3% dos estabelecimentos visitados apresentaram a existência de tais lavatórios, sendo que dos três que não apresentavam tais características e apenas uma das amostras associadas, apresentou qualidade do gelo não conforme.

#### Existência da características e condições associadas aos lavatórios para uma correta limpeza e higienização (item 11 a))

Para além dos três estabelecimentos já referidos anteriormente, neste item existiu mais um que não apresentava conforme o item avaliado neste ponto (mas com qualidade microbiológica do gelo conforme), contabilizando assim um total de 87,1% de amostras que apresentaram as características/condições necessárias.

Observando os resultados obtidos por Mendes (2009), associado a este item, verificou-se que 61% dos estabelecimentos não cumpriam este requisito, enquanto no presente estudo o incumprimento rondou os 12,9%. Em contrapartida a taxa de amostras com incumprimento neste item e com amostras com qualidade não conforme neste estudo foi de 3,2% e contrastando com os 16,1% no estudo de Mendes (2009).

Lavatórios em número suficiente, localizados estrategicamente e com os meios necessários para uma correta lavagem das mãos, evitam em grande parte o número de contaminações cruzadas, uma vez que as mãos são dos principais vetores de contaminação (Regulamento nº 852, 2004). As mãos do pessoal manipulador têm sido identificadas em muitas investigações de DOA como a fonte dos patogénicos para os alimentos implicados (Green et al., 2007; Todd, Michaels, Smith, Greig & Bartleson, 2010).

Estado geral de higiene e limpeza dos manipuladores (item 12)

Verificou-se que em três dos estabelecimentos, os manipuladores inquiridos não apresentaram condições satisfatórias a este nível. Os estabelecimentos (manipuladores) obtiveram tal classificação devido à sujidade apresentada ao nível da roupa dos manipuladores (em dois dos casos) e também às deficientes condições de higiene que apresentavam as mãos, principalmente ao nível das unhas. Destes três casos, apenas a última situação, correspondia a uma amostra não conforme.

Ausência de objectos de adorno (anéis, pulseiras, entre outros) (item 13)

Ao nível da existência de adorno verificou-se em 96,8% dos estabelecimentos visitados, os seus manipuladores apresentaram ausência de tais objectos. No estabelecimento em que tal não se verificou, não influenciou a qualidade da amostra do gelo colhida (amostra 16), uma vez que esta apresentou uma qualidade conforme os requisitos aplicados neste estudo (Regulamento nº 852/2004; Green et al., 2007; Todd, et al., 2010).

#### IV. Conclusões

O presente estudo permitiu caracterizar microbiologicamente o gelo servido aos clientes em estabelecimentos de Restauração e de Bebidas, assim como o modo/procedimento associados à produção e manipulação do gelo e ainda o cumprimento de alguns requisitos associados à segurança alimentar em restauração.

Na bibliografia pesquisada (mais especificamente no ponto designado por Qualidade do Gelo, requisitos microbiológicos) verificou-se a existência de controvérsia acerca dos requisitos microbiológicos necessário para se obter um gelo seguro no âmbito da segurança alimentar. Em muitos países/entidades assumiu-se que o gelo deve apresentar um padrão de qualidade a nível microbiológico idêntico à água de consumo humano, contudo, outros autores, tendo em consideração os procedimentos associados à produção de gelo nos próprios estabelecimentos de Restauração e de Bebidas, consideram que os parâmetros indicadores do nível de higienização deveriam ter valores mais elevados, uma vez que se trata de um produto alimentar exposto a mais contaminações comparativamente com a água. De referir que nenhuma das referências analisadas sobre os requisitos microbiológicos do gelo contemplam a pesquisa de parâmetros indicadores de contaminação inter-humana.

A nível laboratorial foi possível concluir que 25,8% (IC<sub>95</sub> = 9,4-42,1%) das amostras de gelo analisadas não se encontravam de acordo com os requisitos microbiológicos definidos pelo DL n.º 306/2007 (1ª fase da avaliação). A pesquisa adicional dos parâmetros *P. aeruginosa* e Estafilococos C+ (ambos patogénicos, e como tal devem estar ausentes na água/gelo) mostrou que 41,9% (IC<sub>95</sub> = 23,5-60,3%) das amostras analisadas não apresentaram a conformidade exigida (2ª fase da avaliação).

Conclui-se ainda que os parâmetros com maior frequência de positividade (à excepção dos parâmetros indicadores MC a 22 °C, 36 °C e Total de Estafilococos) foram as Bactérias Coliformes e Enterococos (ambos com 19,4%), seguidos das *P. aeruginosa* e Estafilococos C+ (ambos com 9,7%).

Estatisticamente conclui-se que não existiram diferenças significativas entre a avaliação efectuada apenas com os parâmetros descritos no DL n.º 306/2007 e a avaliação efectuada com esses mesmos parâmetros, mais *P. aeruginosa* e Estafilococos C+, contudo constatou-se que houve um incremento de 16,1% de amostras não conformes quando analisados estes dois parâmetros pelo que pode indicar alguma relevância na avaliação da qualidade deste produto.

Ao nível dos parâmetros MC a 22 °C e a 36 °C conclui-se que 48,4% dos resultados obtidos se encontravam acima dos valores de referência (mas não obrigatórios) definidos pelo DL n.º 306/207. Estatisticamente verificou-se uma correlação entre os resultados obtidos para estes dois parâmetros ( $r = 0,680$  e  $p\text{-value} = 0,000$ ) o que indica uma relação entre ambos apesar de tradicionalmente quantificarem microrganismos de origens diferentes.

Já relativamente ao Total de Estafilococos, parâmetro para o qual não existe valor de referência, constatou-se que 35,5% das amostras obtiveram resultados nulos e que dos restantes 15% apresentaram Estafilococos C+.

Os resultados obtidos para os três parâmetros acima mencionados (MC a 22 °C, MC a 36 °C e Total de Estafilococos) e que são indicadores gerais de higiene significam que podem evidenciar falhas ao nível da limpeza e higienização ao longo de todo o processo associado ao gelo.

Estatisticamente conclui-se não existir nenhuma relação entre a 2ª fase de avaliação da qualidade do gelo e o tipo de estabelecimento analisado ou o método usado para produzir o gelo. O mesmo se constatou para a avaliação efectuada ao nível dos MC a 22 °C e a 36 °C.

Dos dados de campo recolhidos conclui-se que o pH (tanto na água de abastecimento como no gelo) se encontra dentro dos valores exigidos pela Lei (DL n.º 306/2007). Contudo a análise ao cloro residual da água de abastecimento público revelou que 61,3% das amostras não obtiveram resultados entre os 0,2 e os 0,6 mg mL<sup>-1</sup>. Tais valores são preocupantes pois trata-se de abastecimentos de água pública, em que um dos requisitos mais importantes, em termos preventivos, é o nível de cloro se encontrar em valores que não produzam efeitos nefastos ao Homem, mas em concentrações mínimas que permitam combater alguma contaminação que possa ocorrer.

Os valores de cloro residual determinados no gelo produzido internamente pelo estabelecimento, permitiu concluir que 90,0% das amostras analisadas obtiveram valores inferiores a 0,2 mg mL<sup>-1</sup>.

A nível estatístico demonstrou-se não existirem diferenças significativas entre os valores de cloro residual determinado na água de abastecimento e no gelo produzido a partir desta. Assim como também não existiram diferenças estatísticas entre os valores de cloro obtidos para a água e para o gelo em relação à avaliação microbiológica do mesmo.

Através dos resultados obtidos microbiologicamente associados ao nível do cloro residual pode-se concluir que existe um risco considerável para a saúde dos consumidores (em especial para os grupos de risco), por terem sido obtidos valores muito elevados ao nível das *P. aeruginosa* e Estafilococos C+.

Em relação aos inquéritos preenchidos aquando da colheita das amostras, a primeira parte deste, testou o cumprimento de alguns dos requisitos associados à segurança alimentar e concluiu-se que a elevada taxa de conformidade (> 90%) não permitiu estabelecer nenhum tipo de relação com a qualidade.

Na segunda fase do inquérito conclui-se que a deficiente qualidade microbiológica do gelo deverá estar associada a fatores múltiplos, uma vez que dos vários itens estudados, só se constataram diferenças estatisticamente relevantes (contudo pouco significativas) ao nível do local onde foi guardado o gelo antes de ser servido aos clientes.

Apesar de não apresentar diferenças a nível estatístico, o facto de 62,9% dos casos em que o gelo foi produzido por máquina não possuir plano de limpeza e higienização das máquinas, de nenhum estabelecimento possuir regras implementadas sobre os cuidados aquando da manipulação do gelo, o facto de não terem mecanismos implementados de controlo de temperatura (mesmo que visuais), leva-nos a concluir que os manipuladores/responsáveis pelos estabelecimentos (incluindo empresas que prestam os serviços de consultoria em HACCP) não estão despertados para o facto de o gelo poder ser contaminado durante todo o seu processo e ser um veículo de propagação de doenças.

Perante o exposto pensa-se ser importante dar continuidade ao presente estudo de modo a obter um maior número de resultados, permitindo assim obter resultados finais mais fiáveis e intervalos de confiança de menor amplitude, pelo que se julga ser relevante incluir este tipo de análise no âmbito da vigilância sanitária desenvolvidos pelos Serviços de Saúde Pública, alargando a zona de amostragem à área de ação da ARSA, principalmente ao Litoral Alentejano, devido à forte actividade balnear/turística que apresenta. Sugerindo ainda que se aproveite a continuação do estudo para identificar e discriminar cada um dos fatores de risco associados à contaminação do gelo que não foi contemplado neste estudo, nos quais de destacam:

- a qualidade microbiológica da água usada para produzir gelo evidenciado assim em que parte do processo ocorreram as falhas;

- nos casos em que são usados baldes ou outros equipamentos para conservar o gelo (sem ser as próprias máquinas) seria importante também verificar a existência e cumprimento do plano de limpeza e higienização desses equipamentos.

- verificar as condições higiénicas dos utensílios usados para servir o gelo aos clientes

Posteriormente será importante divulgar os resultados obtidos às entidades competentes tais como DGS e ASAE no sentido de incentivar a elaboração de valores guias/referências/leis para a qualidade microbiológica do gelo nas quais fossem contemplados os parâmetros de contaminação inter-humana, assim como manual de Boas Práticas associados à produção manipulação do gelo produzido em estabelecimentos de Restauração e Bebidas.

## V. Referências Bibliográficas

- Ali, M. S. & Osman, G. A. (2012). Microbial load as Pollution Indicator in Water of El-Khadra Lake at Wadi El-Natroun, Egypt. *International Journal of Agriculture & Environment*, 3 (4), 41-48.
- 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>
- ARSA (2012a) – *A Água que sai da sua torneira...Informação*, Évora. [Consultado em 29/12/2013]. Disponível em: <http://www.arsalentejo.min-saude.pt/utentes/saudepublica/LaboratorioSaudePublica/Documents/Informação%20para%20águas%20de%20consumo%20humano.pdf>
- ARSA (2012b) – *Procedimento para colheita, conservação e transporte de águas para consumo humano*, Évora. [Consultado em 29/12/2013]. Disponível em: <http://www.arsalentejo.min-saude.pt/utentes/saudepublica/LaboratorioSaudePublica/Paginas/LaboratorioSaudePublica.aspx>
- ARSN (s.d.). *Significado dos parâmetros incluídos na vertente analítica do Programa de Vigilância da Água para Consumo Humano*. [Consultado em 04/08/2014]. Disponível em: [http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Conte%C3%BAdos/Sa%C3%BAde%20P%C3%BAblica%20Conteudos/Agua\\_Consumo\\_tabela.pdf](http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Conte%C3%BAdos/Sa%C3%BAde%20P%C3%BAblica%20Conteudos/Agua_Consumo_tabela.pdf)
- Ashbolt, N.J., Grabow, W.O.K. & Snozzi, M. (2001). Indicators of microbial water quality. In L. Fewtrell e J. Bartram (Eds.), *Water Quality: Guidelines, Standards and Health (WHO)* (pp. 289-316). London, UK: IWA Publishing.
- Bergdoll, M. S. & Wong, A. L. (2006). Staphylococcal Intoxications. In H.P. Riemann e D.O. Cliver (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications* (pp. 523-552). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc.
- Brandão, C. F. S. N. (2002, outubro). *Gestão de riscos sanitários em restauração e hotelaria*. Comunicação apresentada no Congresso de Ciências Veterinárias, Oeiras.
- CAC (2003). *Recommended International Code of Practice – General Principles of Food Hygiene*. CAC/RCP 1.

- Calhau, M. A. (2014). Toxinfecções alimentares, um problema de Saúde Pública. *Boletim Epidemiológica Observações*, Vol 2, No 7, Janeiro-Março, Edições INSA [Consultado em 20/05/2014]. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/PublicacoesRepositorio/Paginas/PublicacoesPeriodicas.aspx>
- Castro, A. C., Nascimento, A. R., Teles, A. M., Chagas, J. W. L. B., Ferreira, M. D. & Jardim, S. S. (2013, Outubro). *Qualidade microbiológica do gelo em cubos comercializado em São Luis – MA*. Comunicação apresentado no 53º Congresso Brasileiro de Química (Química dos Alimentos), Rio de Janeiro, Brasil. [Consultado em 08/01/2014]. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/10/2905-16228.html>
- CDC, 1990. *Surveillance Summaries. Waterborne Disease Outbreaks, 1986-1988*. [Consultado em 13/07/2014]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001596.htm>
- Constable, K. (2013). Safe Ice: The Cold, Hard Facts. *Process Control*, August/Setember [Consultado em 01/11/2014]. Disponível em: <http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/augustseptember-2013/the-sanitation-of-ice-making-equipment/>
- Correia, C. B., Cunha, I. C., Coelho, A.S., Maia, C., Pena, C., Bonito, C. C., ... Calhau, M. A. (2013). Investigação laboratorial de toxinfecções alimentares. *Boletim Epidemiológica Observações*, Vol 2, No 6, Edições INSA. [Consultado em 20/05/2014]. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/PublicacoesRepositorio/Paginas/PublicacoesPeriodicas.aspx>
- Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto. Diário da República n.º164/2007 – I Série, Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, Lisboa, Portugal.
- DGS (2005). *A nova Roda dos Alimentos*. Lisboa. [Consultado em 17/07/2014]. Disponível em: <http://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-1/alimentacao-roda-dos-alimentos.aspx>
- 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.

- EA Part 6 (2010). *Methods for the isolation and enumeration of sulphite-reducing clostridia and Clostridium perfringens by membrane filtration*. The Microbiology of Drinking Water. Bristol, Inglaterra: Environment Agency.
- EFSA (2013). *The European Union Summary Report - 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.
- EFSA (2014). *The European Union Summary Report - Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012*. EFSA Journal 2014, 12(2):3547.doi:10.2903/j.efsa.2014.3547.
- Ferreira M. E., Lopes S. I., Pereira M. D., Rodrigues C. L. & Costa N. F. (2014). Qualidade microbiológica do peixe serra (*Scomberomerus brasiliensis*) e do gelo utilizado na sua conservação. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81 (1), 49-54.
- Ferreira, M. J. (2010). *Características Microbiológicas do Gelo para Consumo Comercializado no Recôncavo Baiano* (Dissertação de Bacharel). Universidade Federal de Recôncavo da Bahia, Brasil.
- FEHD (2005). *The Microbiological Quality of edible ice from ice manufacturing plants and retail businesses in Hong Kong*. Risk Assessment Studies Report N°21. The Government of the Hong Kong Special Administrative Region. China. [Consultado em 19/06/2014]. Disponível em:  
[http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme\\_rafs/files/edible\\_ice\\_ra.pdf](http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/files/edible_ice_ra.pdf)
- Forsythe, S. J. (2010). *The Microbiology of Safe Food*. Nova Iorque, EUA: Wiley-Blackwell.
- FSAI (2007). *Microbiological quality of Ice for Cooling Drinks*. 1<sup>st</sup> National Microbiological Survey 2007 (07NS1) [Consultado em 24/05/2014]. Disponível em:  
[http://www.fsai.ie/uploadedFiles/Monitoring\\_and\\_Enforcement/Monitoring/Surveillance/ice\\_cooling\\_drinks\(1\).pdf](http://www.fsai.ie/uploadedFiles/Monitoring_and_Enforcement/Monitoring/Surveillance/ice_cooling_drinks(1).pdf)
- Gelo expresso (s.d.). [Consultado em 31/01/2014], Disponível em:  
<http://www.geloexpresso.pt>.
- Gerokomou, V., Vaidarou, C., Vatopoulos, A., Velonakis, E., Rozos, G., Alexopoulos, A....Akrida-Demertzi (2011). Physical, chemical and microbiological quality of ice used to cool drinks and foods in Greece and its public health implications. *Anaerobe*, 17, 351-353.

- Green, L. R., Radke, V., Mason, R., Bushnell, L., Reimann, D. W., Mack, J. C.,...Selman, C. A. (2007). Factors Related to Food Worked Hand Hygiene Practives. *Journal of Food Protection*, 70 (3), 661-666.
- Harrigan, W.F. (1998). *Laboratory Methods in Food Microbiology*. San Diego, EUA: Academic Press.
- HPA W5 (2007). *Enumeration of Clostridium perfringens by Membrane Filtration*. National Standard Methods.
- HPA W6 (2007). *Enumeration of Pseudomonas aeruginosa by Membrane Filtration*. National Standard Methods.
- ICMSF (2003). *Microorganisms in Foods, vol 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens* (pp. 20-180). Londres, Reino Unido: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Instituto do Consumidor (2004); Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Guia-Os Alimentos na Roda. Lisboa. [Consultado em 17/07/2014]. Disponível em: <http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Gest%C3%A3o%20do%20Conhecimento/Centro%20Recursos%20Conhecimento/Paginas/Reposit%C3%B3rio/Tematicas/Cuidados%20Saude%20Primarios/PASSE/Docs%20Refer%C3%Aancia%20Complementares/GuiaAlimentosRoda.pdf>
- ISO 6222:1999. *Water quality. Enumeration of culturable micro-organisms. Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium* (1999, 2ª Edition). Genebra, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 7899-2:2000. *Water quality: Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2 – Membrane filtration method* (2000). Genebra, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 8199:2005. *Water quality: General guidance on the enumeration of microorganism by culture* (2005). Genebra, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 9308-1:2000. *Water quality: Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria. Part 1 – Membrane filtration method* (2000). Genebra, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 14189:2013. *Water quality: Enumeration of Clostridium perfringens – Method using membrane filtration* (2013). Genebra, Suíça: International Organization for Standardization.

- ISO 16266:2006. *Water quality – Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa – Method by membrane filtration* (2006). Genebra, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 19458:2006. *Water quality –Sampling for microbiological analysis* (2006). Genebra, Suíça: International Organization for Standardization.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*. Nova Iorque, EUA: Springer.
- Khan, A.S., Moe C. L., Glass, R. I., Monroe, S. S., Estes, M. K., Chapman L. E.,...Schonerger, L. B. (1994). Norwalk Virus-Associated Gastroenteritis Traced to Ice Consumption aboard a cruise ship in Hawaii: Comparison and Application of Molecular Method-Based Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 318-322.
- Kim J. K. & Harrison, M. A. (2008). Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 to Romaine Lettuce due to Contact Water from Melting Ice. *Journal of Food Protection*, Vol 71 (2), 252-256.
- Lateef, A., Oloke, J. K., Kana, E. B. G. & Pacheco, E. (2006). The Microbiological Quality of Ice Used to Cool Drinks and Foods in Ogbomoso Metropolis, Southwest, Nigeria. *Internet Journal of Food Safety*. 8, 39-43.
- Laussucq S., Baltch A. L., Smith R. P., Smithwick R. W., Davis B. J., Desjardin E. K., Silcox V. ... Cohen M.L. (1988). Nosocomial *Mycobacterium fortuitum* Colonization from a Contaminated Ice Machines. *The American review of respiratory Disease*, 138, 891-894.
- Lightfoot, N. F.; Maier E. A. (2003). *Análise Microbiológica de Alimentos e Água – Guia para a Garantia da Qualidade*. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Mako, S. L., Harrison, M. A, Sharma, V. & Kong, F. (2014). *Microbiological quality of packaged ice from various sources in Georgia*. *Journal of Food Protection*, 77 (9):1546-53. Doi:10.4315/0362X.JFP-13-398
- McClane, B.A. (2007). *Clostridium perfringens*. In M. P. Doyle e L. R. Beuchat (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (pp. 423-44). Washington, EUA: ASM Press.
- Mendes, A. L. S. (2009). *Qualidade Microbiológica do Gelo para Consumo Humano em Bebidas, Um Estudo nos Estabelecimentos das Zonas Balneares do Porto* (Dissertação de Mestrado). Universidade do Porto, Portugal.

- Mendes B. e Oliveira J. F.S. (2004). Qualidade da água para consumo humano. *A Água- Desde as Origens aos Dias de Hoje* (p3-144). Lisboa, Portugal: LIDEL.
- 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.
- Moore E. W., Brown E. W. & Hall E. M (1953). Sanitation of Crushed Ice for Iced Drinks. *American Journal of Public Health*, 43 (10),1265-1269. doi: 10.2105/AJPH.43.10.1265
- Nichols, G., Gillespie, I. & Louvois, J. (2000). The microbiological quality of ice used to cool drinks and ready-to-eat food from retail and catering premises in the United Kingdom. *Journal of Food Protection*. 63 (1), 78-82.
- NP 4343:1998. *Qualidade da água. Pesquisa e quantificação de Estafilococos* (1998). Monte da Caparica, Portugal: Instituto Português da Qualidade.
- Parshionikar S. U., Willian-True S., Fout G. S., Robbins D. E., Seys S. A., Cassady J. D. & Harris R. (2003). Waterborne Outbreak of Gastroenteritis Associated with a Norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9), 5263-5268. doi: [10.1128/AEM.69.9.5263-5268.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5263-5268.2003).
- PHE (2011). Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). [Consultado em 27/09/2014. Disponível em: <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/EscherichiaColiO157/>
- Portaria MS nº 2.194/2011. Legislação de Saúde – Série E, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Brasil.
- [Powits, R. W \(2013\). The Sanitation of Ice-Making Equipment. \*Process Control August/September\* \[Consultado em 01/11/2014\]. Disponível em: <http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/augustseptember-2013/the-sanitation-of-ice-making-equipment/>](https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5263-5268.2003)
- Queensland Health (2013). A guide to the safe handling of ice. *Food Safety, Fact Sheet 10*, [Consultado em 19/06/2014]. Disponível em: <http://www.health.qld.gov.au/foodsafety/documents/fs-10-ice.pdf>
- Recomendação IRAR n.º5 (2005). *Método Alternativo para Análise de Bactérias Coliformes e Escherichia coli*. IRAR. [Consultado em 19/02/2014]. Disponível em: <http://www.ersar.pt/website/ViewContent.aspx?SubFolderPath=%5cRoot%5cContents%5cSítio%5cMenuPrincipal%5cDocumentacao%5cPublicacoesIRAR&Section=M>

- [enuPrincipal&FolderPath=%5cRoot%5cContents%5cSitio%5cMenuPrincipal%5cDocumentacao&BookTypeID=21&BookCategoryID=1](#)
- Recomendação IRAR n.º5 (2007). *Desinfecção da Água Destinada ao Consumo Humano*. IRAR. [Consultado em 19/02/2014]. Disponível em: <http://www.ersar.pt/website/ViewContent.aspx?SubFolderPath=%5cRoot%5cContents%5cSitio%5cMenuPrincipal%5cDocumentacao%5cPublicacoesIRAR&Section=MenuPrincipal&FolderPath=%5cRoot%5cContents%5cSitio%5cMenuPrincipal%5cDocumentacao&BookTypeID=21&BookCategoryID=1>
- 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.
- Roberts, D. & Greenwood M (2003). *Practical Food Microbiology*. Massachusetts, EUA: Blackwell Publishing Inc.
- Santos, M.I. & Cunha, I. (2007). Patogénicos emergentes em alimentos. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 1 (2),10-14.
- Santos, M.I.S. (2009, novembro). *Surtos recentes com grande impacto: novos cenários*. Comunicação apresentada no Seminário Toxinfecções Alimentares: A importância da vigilância epidemiológica de base laboratorial, Lisboa.
- Saraiva, M.M. (2011, outubro). *E. coli verotoxigénicos*. Comunicação apresentada na 10ª Reunião Nacional do Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Microbiologia dos Alimentos, Lisboa.
- Viegas, S., Cunha, I., Correia, C., Coelho, A., Maia, C., Pena, C.,...Saraiva, M. (2014). Investigação laboratorial de toxinfecções alimentares, 2013. *Boletim Epidemiológica Observações*, Vol 2, No 7, Edições INSA. [Consultado em 20/05/2014]. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/PublicacoesRepositorio/Paginas/PublicacoesPeriodicas.aspx>
- Special Pathogens Laboratory (2014). Ice Machines: A Source of Legionella Infection. [Consultado em 01/06/2014]. Disponível em: <http://www.specialpathogenslab.com/news-and-events/post.php?s=2014-05-13-ice-machines-a-source-of-legionella-infection>
- Todd, E. C., Michaels, B. S., Smith, D., Greig, J. D. & Bartleson, C. A. (2010). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 9. Washing and drying of hands to reduce microbial contamination. *Journal of Food Protection*. 73 (10), 1937-1955.

- Veiga, A., Lopes, Carrilho, E., Silva, L., Dias, B. M., Seabra, M. J.,...Nunes, S. (2009). *Perfil dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal*. ASAE. [Consultado em 03/01/2014]. Disponível em: [www.asae.pt/](http://www.asae.pt/)
- Western Australian Food Monitoring Program (1999). Ice –The Cold, Hard Facts. *Food Watch* [Consultado em 01/11/2014]. Disponível em: [http://www.public.health.wa.gov.au/cproot/1541/2/Ice\\_The\\_Cold\\_Hard\\_Facts.pdf](http://www.public.health.wa.gov.au/cproot/1541/2/Ice_The_Cold_Hard_Facts.pdf)
- Waturangi, D. E., Wennars, M, Suhartono, M. X. & Wijaya, Y. F. (2013). Edible ice in Jakarta, Indonesia, is contaminated with multidrug-resistant *Vibrio cholerae* with virulence potencial. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 352-3598.
- WHO (1999). *Food Safety: An Essential Public Health Issue for the New Millennium*. [Consultado em: 01/06/2013]. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/65971>
- WHO (2000). *Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 7<sup>th</sup> Report (1993-1998), Country Reports: Portugal*.
- WHO (2001). *Sanitation on Ships-Compendium of outbreaks of foodborne and waterborne disease and Legionnaires´disease associated with ships 1970-2000*. [Consultado em: 01/10/2013]. Disponível em: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/hygiene/ships/en/shipsancomp.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/hygiene/ships/en/shipsancomp.pdf)
- WHO (2003). *Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 8<sup>th</sup> Report, 1999 – 2000*. [Consultado em: 01/10/2013]. Disponível em: [http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp\\_fr.htm](http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm)
- WHO (2011a). *Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth Edition* [Consultado em 06/10/2013] Disponível em: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2011/dwq\\_guidelines/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/)
- WHO (2011b). *Water safety in buildings*. [Consultado em 06/08/2014] Disponível em: [www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2011/9789241548106/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/9789241548106/en/)
- Willshaw, G.A., Cheasty, T. & 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.

## Anexos

## Anexo 1 – Ficha de Identificação de Amostra



A.R.S. ALENTEJO, I.P.  
DEPARTAMENTO DE SAÚDE PÚBLICA E PLANEAMENTO  
LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA - Pólo de Évora

## FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRA

## REQUISIÇÃO DE ENSAIO PARA ESTUDO PILOTO SOBRE A QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO GELO

Corresponde à Ficha de Caracterização de Campo n.º \_\_\_\_\_

Hora de Entrada \_\_\_\_:\_\_\_\_  
(A preencher pelo LSP)

Centro de Saúde de \_\_\_\_\_

IDENTIFICAÇÃO	
Localidade _____	Data ____-____-____ Hora ____:____
Ponto de colheita _____	
Tipo de Estabelecimento: Restaurante <input type="checkbox"/> ; Café <input type="checkbox"/> ; Bar <input type="checkbox"/> ; Restaurante(Hotel) <input type="checkbox"/> ; Bar(Hotel) <input type="checkbox"/>	
Outro <input type="checkbox"/> _____	
Abastecimento de água:	
-Público <input type="checkbox"/>	
-Privado <input type="checkbox"/> (efectuar colheita de água)	
Água Tratada <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tipo de tratamento _____	
Água não Tratada <input type="checkbox"/>	

TIPO DE COLHEITA/AMOSTRAGEM	
- Gelo: Sim <input type="checkbox"/>	Tipo de Análise <input type="checkbox"/> B1+P.aeruginosa+Esfafilococos <input type="checkbox"/> Outra _____
Amostra n.º _____ (A preencher pelo LSP)	
Tipo de Gelo:	
Comercial <input type="checkbox"/> Marca _____ Lote _____	
Produzido no estabelecimento <input type="checkbox"/>	
Outro <input type="checkbox"/> _____	
Ponto de amostragem (imediatamente antes de ser servido ao cliente) _____	
- Água: Sim <input type="checkbox"/>	Tipo de Colheita <input type="checkbox"/> B1 <input type="checkbox"/> Outra _____
Amostra n.º _____ (A preencher pelo LSP)	
Ponto de amostragem (o mais próximo da máquina do gelo, caso exista) _____	

MEDIÇÕES NO LOCAL	
Gelo: Cloro total _____	Cloro residual livre _____ pH _____
Água: Cloro total _____	Cloro residual livre _____ pH _____

OBSERVAÇÕES:
_____
_____

Observações sobre a colheita: Colheita de amostra de gelo obrigatória. A amostra de água para análise dos parâmetros microbiológicos apenas é colhida nos casos em que o estabelecimento utilize um sistema particular de abastecimento de água, independentemente do gelo utilizado ser comercial. O doseamento do cloro terá que ser determinado, obrigatoriamente, no gelo e na água, independentemente de se tratar de gelo comercial ou não, ou do abastecimento de água ser público ou privado.

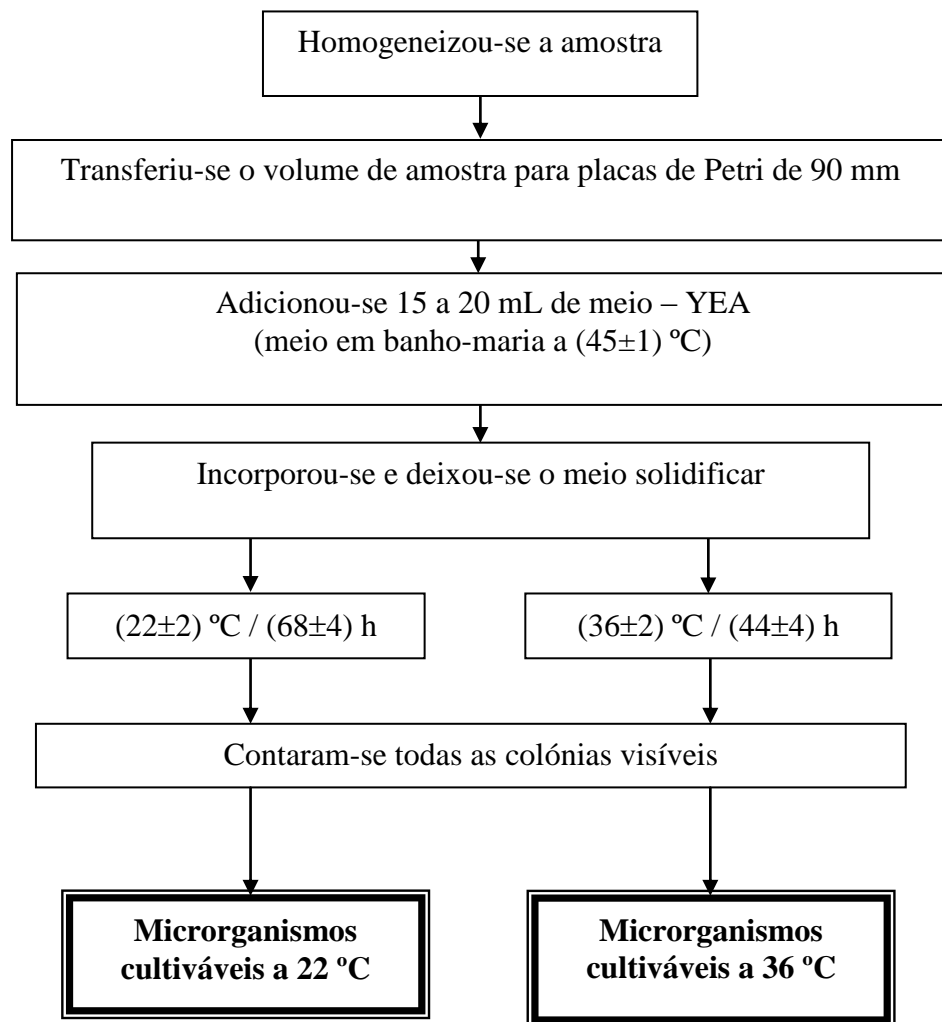
Responsável pela colheita

Responsável pelo transporte

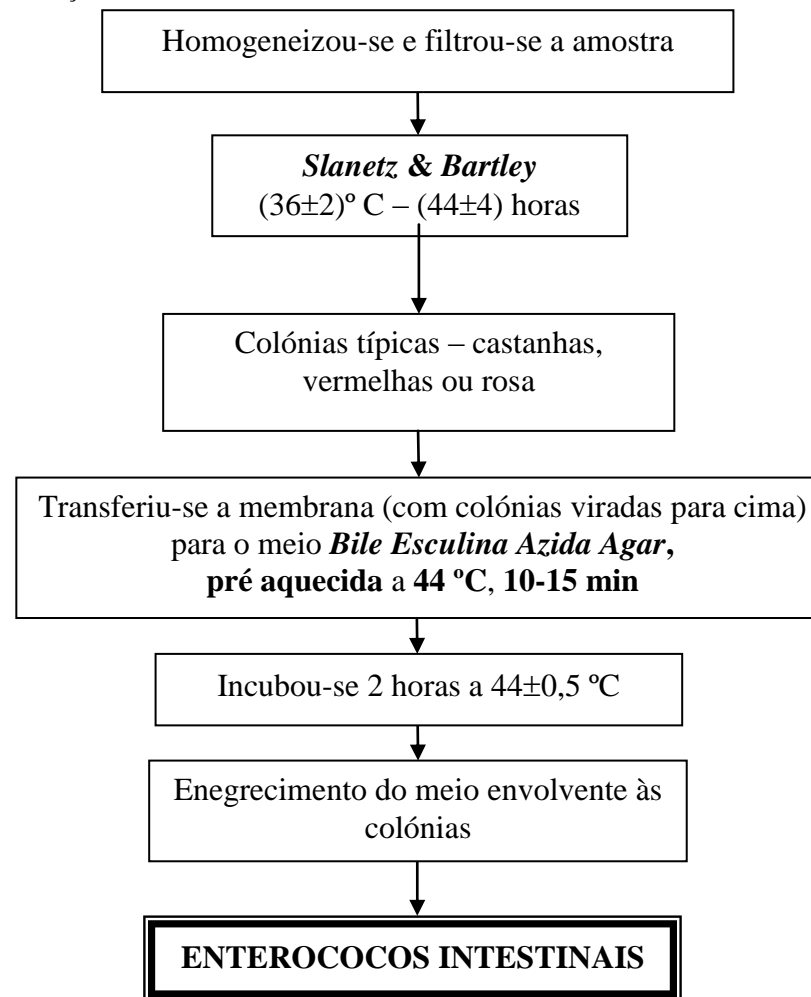
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

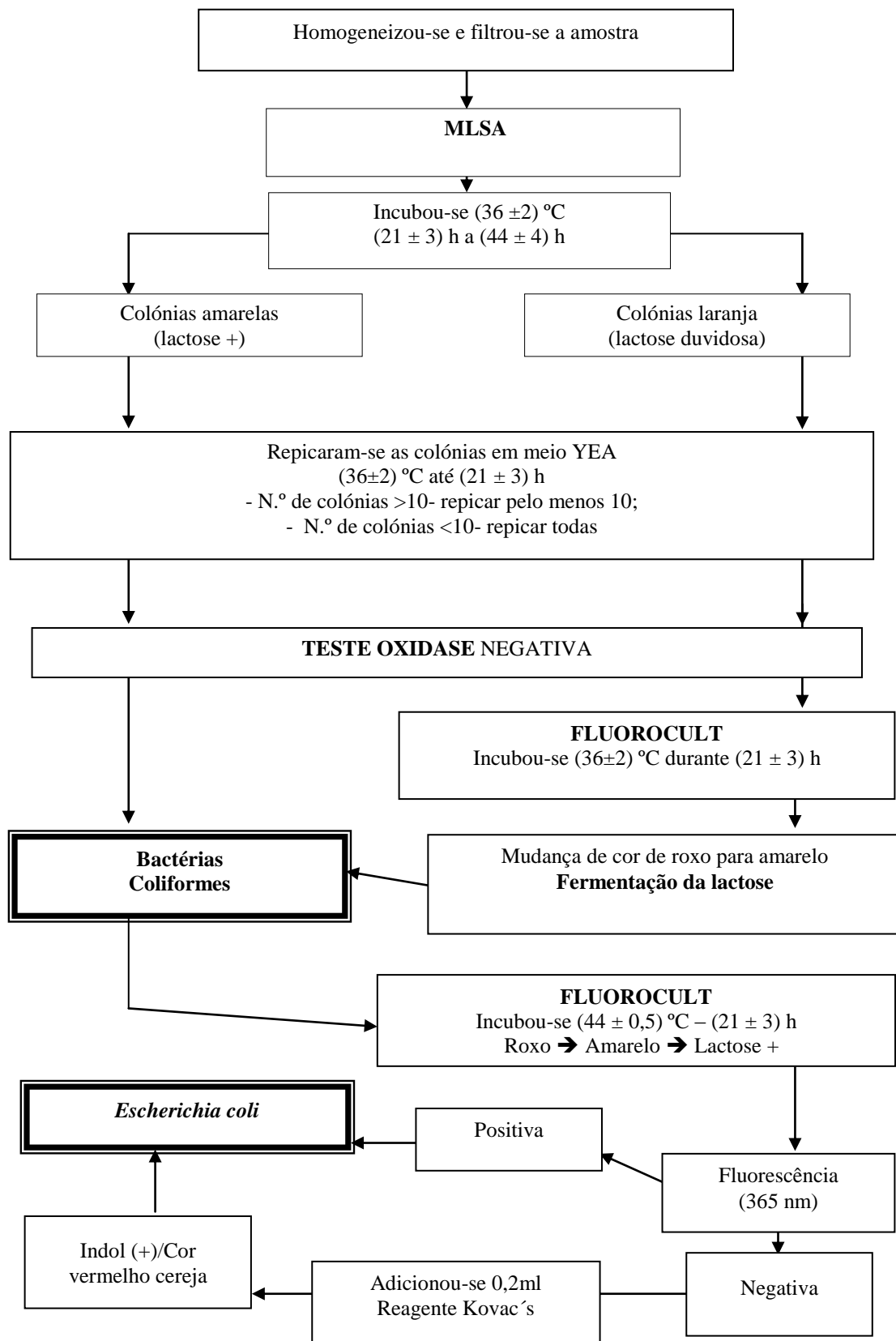
Anexo 2- Fluxograma do procedimento experimental para a quantificação de Microrganismos Cultiváveis a 22 °C e a 36°C



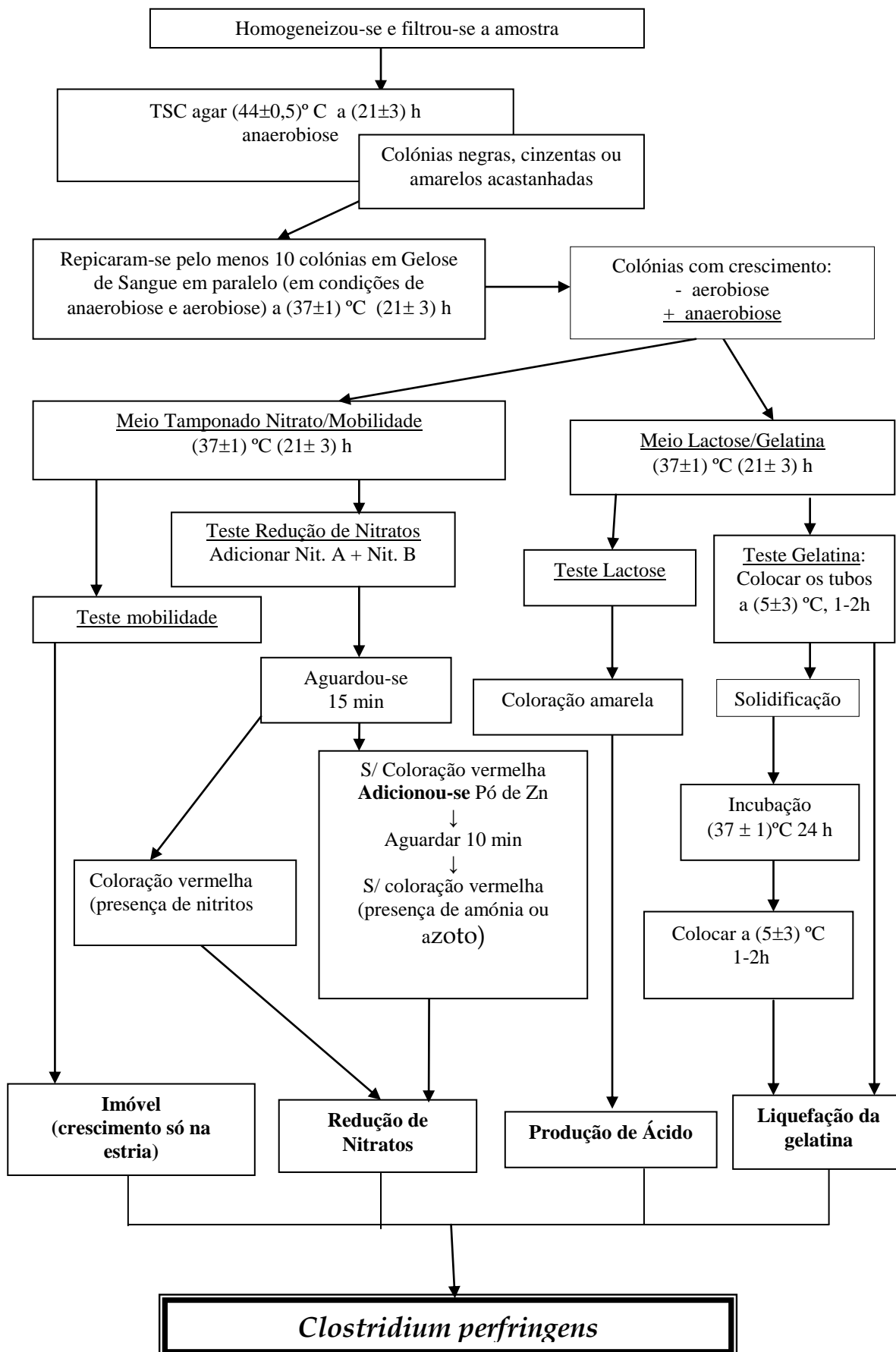
Anexo 3- Fluxograma do procedimento experimental para a pesquisa e quantificação de Enterococos Intestinais



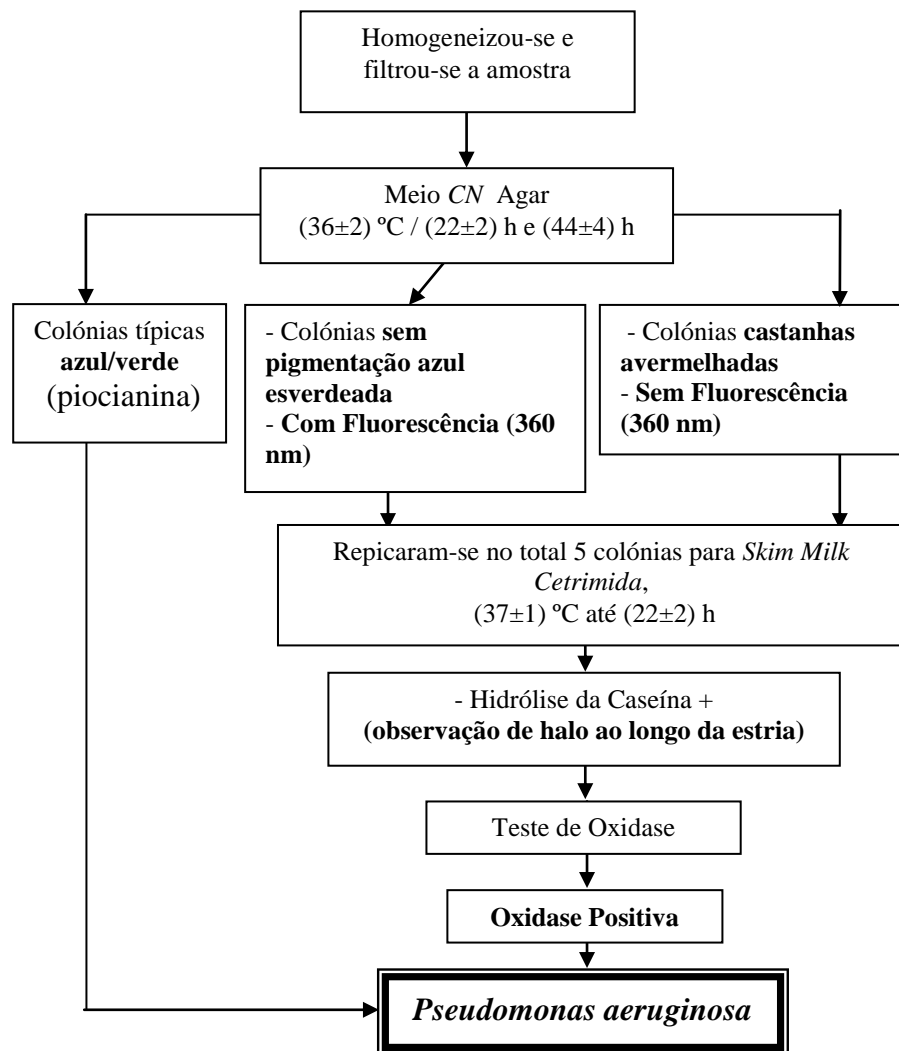
Anexo 4 – Fluxograma do procedimento experimental para a pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes e *E. coli*



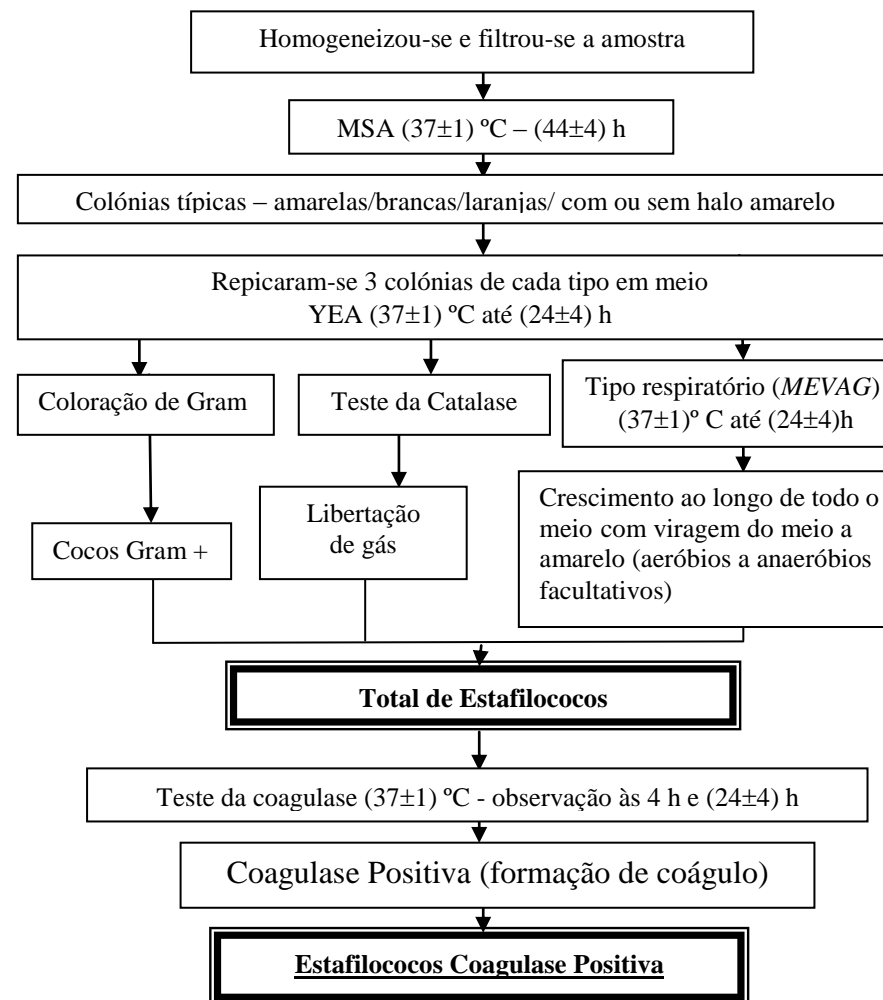
Anexo 5 - Fluxograma do procedimento experimental para a pesquisa e quantificação de *C. perfringens*



Anexo 6 – Fluxograma do procedimento experimental para a pesquisa e quantificação de *P. aeruginosa*



Anexo 7 – Fluxograma do procedimento experimental para a pesquisa e quantificação de Total de Estafilococos e Estafilococos Coagulase Positiva



## Anexo 8 – Ficha de Caracterização de Campo



GOVERNO DE  
PORTUGAL

MINISTÉRIO DA SAÚDE

A.R.S. ALENTEJO, I.P.  
DEPARTAMENTO DE SAÚDE PÚBLICA E PLANEAMENTO  
LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA - Pólo de Évora

### Ficha de caracterização de campo Nº \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_

Nome do estabelecimento: \_\_\_\_\_

Morada: \_\_\_\_\_

#### Características Gerais

-Existência de sistema HACCP e/ou boas práticas de higiene e fabrico  Sim  Não

Se sim, existem evidências?  Sim  Não. Quais \_\_\_\_\_

-Condições gerais do estabelecimento são aceitáveis (limpo, organizado, material em bom estado, entre outros)?  Sim  Não

Se não, justificar \_\_\_\_\_

-A concepção do espaço de copa/cozinha apresenta a marcha em frente?  Sim  Não  Não aplicável

-Existe um programa de limpeza e desinfeção das instalações e equipamentos?  Sim  Não

-Existe um programa de prevenção/controlo de pragas, executado por profissionais?  Sim  Não

- Equipamento para eliminação de insectos?  Sim  Não

-Os contentores para resíduos apresentam tampa accionada por pedal e revestidos com sacos de plástico?  
 Sim  Não

-Os manipuladores/pessoal têm formação básica em Higiene e Segurança Alimentar?  Sim  Não,

-Instalações sanitários/vestiários devidamente separados das zonas de laboração, com correta ventilação e manutenção?  Sim  Não

- O estabelecimento apresenta Serviços de Higiene e Segurança no Trabalho?  Sim  Não

## Anexo 8 (continuação)



GOVERNO DE  
PORTUGAL

MINISTÉRIO DA SAÚDE

A.R.S. ALENTEJO, I.P.  
DEPARTAMENTO DE SAÚDE PÚBLICA E PLANEAMENTO  
LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA - Pólo de Évora

Boas práticas de produção e manuseamento de gelo

1. O estabelecimento utiliza gelo?  Sim  Não
2. Tipo(s) de utilização(ões) do gelo
  - Refrigerar bebidas/Contacto direto com as bebidas
  - Refrigerar alimentos/Contacto direto com os alimentos
  - Outras. Quais? \_\_\_\_\_.
3. O gelo é:  produzido no estabelecimento
  - adquirido comercialmente. Neste caso o produto é controlado e rastreado aquando da sua recepção?  Não  Sim, se sim, descreva  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_.
  - Marca \_\_\_\_\_ Lote \_\_\_\_\_
  - Outra \_\_\_\_\_.

Se a resposta for **Adquirido comercialmente** não responder à questão seguinte, incluindo as suas alíneas.

4. Qual é o equipamento usado para produzir gelo? \_\_\_\_\_
  - 4.1. Marca do equipamento: \_\_\_\_\_
  - 4.2. Modelo \_\_\_\_\_
  - 4.3. A água usada para produção do gelo provem de um sistema de abastecimento público?  
 Sim  Não, se Não, existe um programa de controlo da mesma adequado?  Sim  Não

Caso a resposta seja **Não**, colher amostra da água que abastece a máquina de produção de gelo. O ponto de colheita da rede dever ser o mais próximo possível da máquina.

  - 4.4. A máquina possui válvula de retorno de água na entrada de alimentação?  Sim  Não
  - 4.5. Reservatório de água e o compartimento de armazenamento de gelo são isolados  Sim  Não
  - 4.6. A máquina tem alguma ligação ao esgoto?  Sim  Não
    - 4.6.1. Se **Sim**, existe válvula de retorno ou algo que impeça retorno do caudal?  Sim  Não
  - 4.7. Os diferentes compartimentos da máquina encontram-se limpos?  Sim  Não  
 Se Não, justificar \_\_\_\_\_
  - 4.8. A porta da máquina encontrava-se fechada?  Sim  Não
  - 4.9. Localização da máquina \_\_\_\_\_  
 Indicar também se está localizada numa zona de limpos ou sujos.
  - 4.10. Existe um plano de limpeza e higienização da máquina de produção de gelo?  Sim  Não

## Anexo 8 (continuação)



GOVERNO DE  
PORTUGAL

A.R.S. ALENTEJO, I.P.  
DEPARTAMENTO DE SAÚDE PÚBLICA E PLANEAMENTO  
LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA - Pólo de Évora

MINISTÉRIO DA SAÚDE

4.11. Qual a periodicidade de execução da limpeza interior e exterior?

\_\_\_\_\_

4.12. Data da realização da última limpeza \_\_\_\_\_

4.13. Observações pertinentes sobre plano/limpeza \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

4.14. Existe um programa de manutenção preventiva da máquina?  Sim  Não

5. Existe algum procedimento/regra escrito implementado(a) sobre cuidados a ter na manipulação do gelo?  Sim  Não

Se sim, qual(ais)? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

6. O gelo é conservado (até ao momento antes de ser servido ao cliente) noutra equipamento para além do compartimento de armazenamento da máquina ou do saco em que é adquirido?  Sim  Não

Se sim:

6.1. Descreva os equipamentos/procedimentos utilizados desde a sua produção (q.a.) até à sua utilização? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

6.2. E qual o equipamento em que é conservado antes da sua utilização final?

Balde de Gelo

Arca congeladora. Em que condições? \_\_\_\_\_

Outro. Em que condições? \_\_\_\_\_

(verificar se o equipamento usado para conservação tem capacidade adequada e se o gelo não é colocado em compartimento que contém alimentos)

7. As temperaturas de conservação do gelo são possíveis de ser controladas e registadas através de termómetros calibrados regularmente?  Sim  Sim, mas com termómetro não calibrado  Não

8. Qual o forma/utensílio utilizado para manusear o gelo?

Pá/colher específica  À mão mas com luva  À mão mas sem luva  Outra \_\_\_\_\_

9. Onde costuma ser guardado esse utensílio usado para transferir o gelo (protegido de contaminação)? \_\_\_\_\_

10. Periodicidade de limpeza e higienização/substituição desse utensílio? \_\_\_\_\_

11. Existem lavatórios exclusivos para os funcionários localizados perto da máquina/balde de gelo?

Sim  Não

a) E apresentam água quente e fria, sabão líquido com propriedades desinfectantes e toalhetes de papel para secar as mãos (ou outro sistema de secagem higiénica)?  Sim  Não

12. Estado geral de higiene e limpeza dos manipuladores de gelo, incluindo mãos e unhas é aceitável?

Sim  Não

13. Ausência de objectos de adorno (tais como: anéis, pulseiras, entre outros)?  Sim  Não

14. Utilização de forma correcta de luvas descartáveis (se aplicável)?  Sim  Não

Anexo 9 – Resultados analíticos determinados para os parâmetros de campo (cloro e pH) nas amostras de águas de abastecimento e de gelo e caracterização do tipo de estabelecimento, assim como o método de produção de gelo utilizado

ID Amostra	Tipo Estabelecimento	Método de produção	Parâmetros de Campo					
			Água de Abastecimento			Gelo		
			Cloro Total (mg mL <sup>-1</sup> )	Cloro Residual (mg mL <sup>-1</sup> )	pH	Cloro Total (mg mL <sup>-1</sup> )	Cloro Residual (mg mL <sup>-1</sup> )	pH
1	Rest	Maq	0,68	0,18	7,30	0,15	0,15	8,18
2	Rest	Maq	0,62	0,62	7,42	0,59	0,18	8,23
3	Hotel	Maq	0,30	0,25	7,40	0,66	0,37	8,17
4	Rest	Maq	0,10	0,00	7,50	0,02	0,02	6,92
5	Rest	Maq	0,07	0,07	7,30	0,11	0,06	7,90
6	Hotel	Maq	0,45	0,24	7,64	0,38	0,38	7,34
7	Hotel	Maq	0,26	0,13	7,70	0,26	0,13	7,82
8	Café	Maq	0,83	0,61	7,40	0,12	0,09	7,63
9	Rest	Maq	0,90	0,52	7,59	0,33	0,33	7,65
10	Café	Maq	0,90	0,26	7,60	0,40	0,00	7,60
11	Café	Maq	0,79	0,74	7,66	0,03	0,00	7,70
12	Hotel	Maq	0,52	0,19	7,82	0,63	0,11	7,50
13	Hotel	Maq	0,69	0,12	7,60	0,30	0,00	7,60
14	Rest	Maq	0,52	0,05	7,55	0,59	0,12	7,60
15	Hotel	Maq	0,32	0,03	7,81	0,00	0,04	6,55
16	Rest	Saco	0,01	0,00	7,80	0,12	0,12	6,89
17	Rest	Maq	0,17	0,06	7,93	0,10	0,08	6,97
18	Rest	Maq	0,11	0,00	7,83	0,10	0,00	7,41
19	Café	Maq	0,47	0,35	7,10	0,02	0,00	7,10
20	Rest	Maq	0,72	0,51	7,70	0,21	0,11	7,05
21	Café	Maq	0,82	0,72	7,64	0,18	0,18	6,70
22	Rest	Maq	0,78	0,36	7,54	0,27	0,03	6,64
23	Rest	Maq	0,42	0,09	7,50	0,07	0,00	6,83
24	Hotel	Maq	0,16	0,04	7,86	0,41	0,00	7,83
25	Café	Maq	0,63	0,45	7,80	0,34	0,08	7,53
26	Café	Maq	0,83	0,59	7,74	0,34	0,06	7,05
27	Café	Maq	0,69	0,50	7,50	0,08	0,05	7,32
28	Café	Cuvetes	0,44	0,14	7,34	0,12	0,10	7,63
29	Rest	Comercial	0,40	0,28	7,98	0,00	0,00	6,80
30	Rest	Maq	0,29	0,28	7,50	0,14	0,11	7,52
31	Rest	Maq	0,06	0,03	7,38	0,07	0,03	7,85

Em que: Rest = Restaurante; Hotel = Hotel Bar/Restaurante; Café = Café/Bar/Cafeteria; Maq = Máquina de gelo do próprio estabelecimento; Saco = Sacos de congelação.

Anexo 10 – Resultados dos parâmetros microbiológicos

ID Amostra	MC		Parâmetros Microbiológicos						Total Estaf	Estaf C+
	22 °C	36 °C	BC	<i>E.coli</i>	Entero	<i>C. perfringens</i>	<i>P. aeruginosa</i>			
	ufc mL <sup>-1</sup>		ufc 100 mL <sup>-1</sup>							
1	28	15	0	0	0	0	0	2	0	
2	28	3	3	0	0	0	0	0	0	
3	1540	99	0	0	0	0	0	8	0	
4	2840	64	0	0	0	0	0	>100	0	
5	66	46	0	0	2	0	0	6	0	
6	780	18	4	1	1	0	0	>100	0	
7	40	21	0	0	0	0	0	0	0	
8	116	30	0	0	0	0	0	3	0	
9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	77	0	0	0	0	0	0	12	6	
11	25	26	0	0	0	0	0	0	0	
12	249	43	0	0	0	0	0	0	0	
13	>3000	750	0	0	0	0	>80	0	0	
14	72	19	0	0	0	0	0	0	0	
15	28	8	0	0	0	0	0	0	0	
16	1640	2100	0	0	13	2	0	>100	>100	
17	1930	2600	14	0	1	0	0	>100	0	
18	730	54	5	0	0	0	0	>100	0	
19	51	5	0	0	0	0	0	82	0	
20	1	2	0	0	0	0	0	26	26	
21	420	29	0	0	0	0	3	0	0	
22	100	5	0	0	0	0	1	0	0	
23	36	0	0	0	0	0	0	1	0	
24	188	45	0	0	0	0	0	0	0	
25	136	14	0	0	0	0	0	5	0	
26	680	13	0	0	0	0	0	17	0	
27	8	16	0	0	0	0	0	71	0	
28	18	11	1	0	1	0	0	>100	0	
29	75	47	4	0	7	0	0	>100	0	
30	1190	32	0	0	0	0	0	3	0	
31	730	10	0	0	0	0	0	6	0	

em que: MC = Microrganismos cultiváveis; BC =Bactérias Coliformes; Entero = Enterococos Intestinais; Total Estaf = Total de Estafilococos; Estaf C+ = Estafilococos Coagulase Positiva