

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



MÁQUINAS AUTOMÁTICAS DISPENSADORAS DE BEBIDAS QUENTES: INSPEÇÃO E  
AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRORGANISMOS POTENCIALMENTE PATOGENICOS

SANDRA DANIELA VIEIRA BASTOS

ORIENTADORA:  
Doutora Teresa Maria Leitão Semedo  
Lemsaddek

COORIENTADOR:  
Engenheiro Nuno Miguel Ferreira Dantas

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



MÁQUINAS AUTOMÁTICAS DISPENSADORAS DE BEBIDAS QUENTES: INSPEÇÃO E  
AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRORGANISMOS POTENCIALMENTE PATOGÉNICOS

SANDRA DANIELA VIEIRA BASTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

JÚRI:

PRESIDENTE:

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

VOGAIS:

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de  
Oliveira

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo  
Lemsaddek

ORIENTADORA:

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo  
Lemsaddek

COORIENTADOR:

Engenheiro Nuno Miguel Ferreira Dantas

2021

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Sandra Daniela Vieira Bastos

Título da Tese ou  
Dissertação: Máquinas automáticas dispensadoras de bebidas quentes: inspeção e avaliação da presença de microrganismos potencialmente patogénicos

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso  
de Mestrado ou de  
Doutoramento: Segurança Alimentar

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica  Produção Animal e Segurança Alimentar  
 Morfologia e Função  Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, \_27\_ de \_\_\_\_ Maio \_\_\_\_ de 2021\_\_

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: \_\_\_\_\_



**FCT**  
Fundação  
para a Ciência  
e a Tecnologia



Este trabalho foi financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto UIDB / 00276/2020, através do apoio do CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa

## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho marca o fim de uma importante etapa da minha vida, como tal gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a sua concretização.

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à minha orientadora, Professora Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek, pela motivação, por estar sempre disponível para ajudar e transmitir os seus conhecimentos e à Rita Leite que contribui largamente para que este trabalho fosse realizado através do seu projeto de estágio. Gostaria de deixar um agradecimento à empresa de *vending* onde exerço funções, pela possibilidade de fazer o presente estudo e ao responsável do departamento de qualidade, Engenheiro Nuno Dantas, pelas sugestões e disponibilidade em responder aos meus pedidos.

Aos vários elementos da equipa que integrei, pela ajuda prestada, por todos os conhecimentos transmitidos, pela simpatia e companheirismo: Francisca Eusébio, Vanessa Félix, Maria Helena Fernandes e Engenheira Maria José Fernandes. Aos meus colegas de turma, que foram simplesmente os melhores colegas que podia ter tido.

Aos meus pais, José e Rosa. Sou eternamente grata pelo vosso amor e apoio e por todos os valores que me transmitiram. Ao meu irmão Paulo e à minha cunhada Cristina, que apesar de longe, ajudam a que tudo se mantenha no seu lugar e asseguram o nosso «porto seguro».

Por último, mas não menos importante, agradecer ao meu marido Sérgio e às nossas filhas Gabriela e Julieta. Vocês são a minha maior motivação e o vosso sorriso o meu maior consolo.

# Máquinas automáticas dispensadoras de bebidas quentes: inspeção e avaliação da presença de microrganismos potencialmente patogênicos

## Resumo

Estima-se que 600 milhões de pessoas adoecem depois da ingestão de alimentos contaminados, resultando em mais de 420 mil mortes. Na indústria do *vending*, conhecem-se poucos surtos de toxinfecção alimentar associados à utilização das máquinas dispensadoras de bebidas quentes, mas tendo em conta o aumento da procura deste tipo de serviços e a especificidade dos equipamentos, são prementes estudos adicionais. Neste contexto, os objetivos principais do presente estudo foram realizar a inspeção de 19 máquinas dispensadoras de bebidas quentes de acordo com uma *check list* previamente definida e pesquisar a ocorrência de microrganismos potencialmente patogênicos e/ou deteriorantes. Em paralelo, foram recolhidas amostras de superfícies e consumíveis, tendo sido pesquisados fungos, bactérias Gram-positivas como, *Bacillus cereus*, *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., e Gram-negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp. Alguns dos microrganismos recolhidos foram ainda avaliados quanto à sua capacidade de produzir biofilme, resistência a antibióticos e atividade hemolítica, de forma a inferir acerca do seu potencial patogênico.

As inspeções revelaram baixa incidência de “não conformidades”, e o ponto mais referenciado (15,7%) foi sujidades no balde e tabuleiro de resíduos). A análise microbiana revelou a predominância de bolores e leveduras nas amostras em estudo. *Pseudomonas* spp., apesar de menos frequentes, atingiram as maiores contagens ( $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>) e 7,9% das amostras de superfícies, obteve valores acima do limite legal estabelecido para estafilococos coagulase positivos. Uma das amostras de água, revelou possuir *Enterococcus* spp., resultado considerado insatisfatório, do ponto de vista legal. Verificou-se ainda que os microrganismos em estudo têm diferentes níveis de potencial de patogenicidade, com *Pseudomonas* spp. a destacarem-se dentro do grupo analisado, pela elevada produção de biofilme e resistência a antibióticos como imipenem (75%) e aztreonam (100%).

Em conclusão, ficou demonstrado que apesar de não existir correlação entre a percentagem de “não conformidades” e a presença de microrganismos, a ampla disseminação de bolores e leveduras indica falhas no processo de higienização. A presença de *Pseudomonas* spp., com capacidade de formar biofilmes, associadas a um fenótipo de resistência a antibióticos clinicamente importantes é um dado preocupante. Adicionalmente, tendo em conta os resultados obtidos e o escasso número de estudos nesta área do conhecimento, recomenda-se a continuação destas análises, de forma a garantir a segurança do consumidor de bebidas dispensadas por este tipo de equipamento.

**Palavras-chave:** Máquinas de venda automática, inspeção, microrganismos, patogenicidade.

# Hot beverage dispensing machines: inspection, microbial isolation and evaluation of pathogenicity potencial

## Abstract

An estimated 600 million people fall ill after eating contaminated food, resulting in more than 420.000 deaths. In the vending industry, there are few outbreaks of foodborne illness associated with the use of hot beverages machines but given the increase demand for this type of services and the specificity of the equipment, more studies are needed. In this context, the main objectives of the present study were to inspect 19 hot beverage dispensing machines, according to a previously defined check list, and investigate the occurrence of potentially pathogenic and/or deteriorating microorganisms. In parallel, samples of surfaces and consumables were collected. The presence of fungi, Gram positive bacteria such as *Bacillus cereus*, *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. and Gram negative, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas* spp., was assessed. Some of the microorganisms collected were also evaluated for their ability to produce biofilm, antibiotic resistance, and hemolytic activity, to infer on their pathogenicity potencial.

Inspections revealed a low incidence of "non-conformities", with point 8 (bucket and waste tray), as the most referred (15.7%). Microbial analysis revealed the predominance of molds and yeasts in the samples under study. *Pseudomonas* spp., although less frequent, reached the highest counts ( $10^5$ CFU/cm<sup>2</sup>) and 7.9% of surface samples exceeded the established legal limit concerning coagulase positive staphylococci. One of the water samples revealed *Enterococcus* spp., an unsatisfactory result, from the legal point of view. It was also verified that the microorganisms under study possess different levels of pathogenicity potencial, with *Pseudomonas* spp. standing out within the analyzed group, due to the high production of biofilm and antibiotic resistance to aztreonam (100%) and imipenem (75%).

In conclusion, it was demonstrated that although no correlation could be found between the percentage of "nonconformities" and the presence of microorganisms, the wide spread of molds and yeasts indicates flaws in the hygiene process. The presence of *Pseudomonas* spp., with the ability to form biofilms, associated with a phenotype of resistance to clinically important antibiotics is a worrisome fact. Considering the results obtained and the small number of studies in this area of knowledge, it is recommended that these analyses should continue to ensure the safety of consumers of beverages dispensed by this type of equipment.

**Keywords:** Vending machines, inspection, microorganisms, pathogenicity

## Índice geral

Agradecimentos .....	iv
Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Índice geral .....	vii
Índice de Figuras .....	x
Índice de Tabelas .....	xi
I. INTRODUÇÃO .....	1
1. HISTÓRIA DO VENDING .....	1
2. ATUALIDADE .....	1
3. ENQUADRAMENTO DO <i>VENDING</i> NAS DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR .....	2
4. OBJETIVOS .....	3
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS ACERCA DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	5
1.1. Microrganismos e sua relação com os alimentos .....	5
1.2. Formação de biofilmes .....	5
1.2.1. Definição .....	5
1.2.2. Composição .....	6
1.2.3. Etapas de formação .....	6
1.2.4. Fatores que influenciam a formação .....	7
2.3. Resistência a antibióticos .....	8
2.4. Capacidade hemolítica .....	9
3. MICRORGANISMOS DE INTERESSE NO ÂMBITO DO ESTUDO .....	9
3.1. Bolores .....	10
3.2. Leveduras .....	11
3.3. <i>Bacillus cereus</i> .....	11
3.4. <i>Enterococcus</i> spp. ....	12
3.5. <i>Staphylococcus</i> spp. ....	14



3.6. <i>Escherichia coli</i> .....	16
3.7. <i>Pseudomonas</i> spp.....	17
4. IMPORTÂNCIA DOS SISTEMAS DE CONTROLO ALIMENTAR NO <i>VENDING</i> .....	19
4.1. Verificação de procedimentos .....	20
4.1.1. Controlo qualitativo-inspeção .....	21
4.1.2. Controlo quantitativo-análises microbiológicas .....	21
5. CARACTERIZAÇÃO DA MÁQUINA DISPENSADORA DE BEBIDAS QUENTES .....	22
5.1. Abastecimento e inspeção .....	23
5.2. Permanência de produtos na máquina – leite em pó .....	24
5.3. Água de fornecimento .....	25
5.4. Mistura de ingredientes- temperatura da água .....	27
5.5. Tubo dispensador.....	28
5.6. Dispensador de copos.....	29
III MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
1. ENQUADRAMENTO.....	30
2. INSPEÇÃO E REGISTO DE TEMPERATURAS E HUMIDADES.....	30
3. PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS E METODOLOGIAS.....	31
3.1. Processo de recolha e receção .....	31
3.2. Preparação e análise microbiológica .....	32
4. CONTAGEM E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	34
5. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA - PCR (RAPD) .....	34
5.1. Extração de DNA.....	35
5.2. Amplificação por PCR .....	35
5.3. Eletroforese .....	35
6. POTENCIAL PATOGÉNICO .....	36
6.1. Avaliação da capacidade de produção de biofilme .....	36
6.2. Análise de dados.....	37
6.3. Resistência a antibióticos .....	37
6.4. Actividade hemolítica.....	38

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
1. RESULTADOS QUALITATIVOS.....	39
2.RESULTADOS QUANTITATIVOS .....	40
3. SELEÇÃO DE REPRESENTANTES.....	47
4. RESULTADOS QUALITATIVOS <i>VERSUS</i> RESULTADOS QUANTITATIVOS .....	48
5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PATOGENICO.....	49
V CONCLUSÃO.....	55
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
ANEXOS.....	77

## Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática das etapas de desenvolvimento de biofilmes.....	6
Figura 2 - Fluxograma do funcionamento de máquina dispensadora de bebidas quentes....	22
Figura 3 - Percentagens de cada “não conformidade” em cada ponto de controlo nas 19 supervisões efetuadas ao longo do estudo.....	39
Figura 4 - Percentagens de não conformidades por máquina amostrada.....	40
Figura 5 - Tabuleiro de máquina dispensadora de bebidas quentes, com presença visual de bolores.....	43
Figura 6 - Gráfico de dispersão entre as variáveis analisadas: contagens de <i>Pseudomonas</i> spp. versus percentagem de não “conformidades”.....	49
Figura 7 - Medição da formação de biofilme dos isolados obtidos através dos valores de absorvância. ....	50
Figura 8 - Temperatura e humidade relativa das máquinas 2 e 15 no mês de Agosto.....	86
Figura 9 - Temperatura e humidade relativa das máquinas 2 e 15 no mês de Setembro....	86
Figura 10 - Temperatura e humidade relativa das máquinas 2 e 15 no mês de Outubro.....	86

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Lista de pontos de controlo definidos para máquinas dispensadoras de bebidas quentes.....	30
Tabela 2 - Microrganismos analisados e respetivos produtos/equipamentos.....	31
Tabela 3 - Meios de cultura, detalhes de inoculação, características das colónias e normas ISO utilizadas para efeitos de enumeração.....	33
Tabela 4 - Antibióticos, classes, alvos e concentrações utilizadas.....	37
Tabela 5 - Resultados microbiológicos .....	41
Tabela 6 - Caracterização macroscópica e microscópica das colónias isoladas do meio <i>Bacillus cereus Selective Agar</i> .....	45
Tabela 7 - Isolados selecionados e respetiva origem.....	48
Tabela 8 - Perfil de sensibilidade dos isolados a antibióticos de nove classes diferentes....	52
Tabela 9 - Máquinas, características e valores médios de temperatura e humidade relativa..	78
Tabela 10 - Plano de higienização em vigor na empresa de <i>vending</i> .....	81
Tabela 11 - Valores guia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para microrganismos patogénicos e indicadores do Sub-grupo 1A.....	84
Tabela 12 - Valores guia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para superfícies de contacto .....	84
Tabela 13 - Critérios microbiológicos para a categoria de leite em pó.....	85
Tabela 14 - Classificação e análise estatística dos isolados relativamente à capacidade de formação de biofilme.....	87
Tabela 15 - Limites de suscetibilidade para antibióticos .....	88

## I.INTRODUÇÃO

### 1.HISTÓRIA DO VENDING

*“Of the salesman`s work, 60% is the work of an automaton. Why not give most of this sort of work to an automaton?”*

*A.Granat, 1928*

Na tradução literal do inglês, *vending machine* significa “máquina de venda”. Também conhecidas como máquinas automáticas de bebidas ou alimentos, vendem produtos variados como, por exemplo, cafés, lanches, doces, refrigerantes e qualquer tipo de produto que lhe possamos adaptar. Basta que o cliente coloque o valor estipulado na máquina e aguarde que o produto seja libertado.

A primeira máquina de *vending* foi inventada na antiga Grécia por Héron, engenheiro e matemático de Alexandria, considerado um dos grandes inventores da antiguidade, em 215 A.C. A máquina dispensava água benta em templos egípcios, a troco de moedas (Bellis, 2020). Desde então, vários modelos de máquinas foram sendo construídos para os mais diversos objetivos, desde a venda de cartões-postais até chicletes, e não tardou a que os vendedores de bebidas as utilizassem para a venda de bebidas refrigeradas, como a empresa Coca-Cola, cujo negócio prolifera desde 1937 (Segrave, 2015). É a partir de 1908 que começaram a surgir as primeiras máquinas dispensadoras de refrigerantes em copos, facto que inicialmente gerou críticas por parte do público devido a questões sanitárias, mas após a formação da companhia *Public Cup vendor Company* de Nova Iorque, o comércio proliferou, tornando-se exclusivamente um negócio de venda de copos.

A primeira máquina de venda automática de café foi inventada nos Estados Unidos pela companhia *Rudd-Melikian* de Filadélfia, Pensilvânia, em 1947, e chamada de *Kwik Kafe*. A máquina deixava cair uma chávena de papel, através de um paraquedas, sobre uma plataforma e enchia a chávena com café quente, preparado com café instantâneo e água quente, demorando cinco segundos a preparar esta bebida. As máquinas *Kwik Kafe* foram colocadas em vários locais dos Estados Unidos da América, através do processo de franchising. Por meio de uma operação de franquias, a empresa começou a deslocar-se para o local de trabalho e no ano de 1955, passaram a existir mais de 60,000 máquinas de venda de café nos Estados Unidos (Marion & Oliver 2014).

## 2. ATUALIDADE

Dados da Associação Europeia de *Vending* (EVA) relativos a 2018, reportam que o número total de máquinas de *vending* na União Europeia (UE) é de 4,116 milhões de unidades no universo dos 22 países analisados e que a França, Alemanha, Itália, Espanha, Reino Unido e Holanda, perfazem 74% desse total. A média de máquinas por pessoa na Europa é de uma

máquina para cada 180 pessoas. Relativamente ao número de vendas, estas atingiram 34,865 bilhões em 2018 e a venda de bebidas quentes representou 79% da receita. As receitas obtidas em 2018, foram de 16,4 bilhões de euros, o que representou um crescimento de 3,9% face ao ano anterior (EVA 2019b).

Em Portugal, o negócio das máquinas de *vending* tem sofrido uma grande expansão nestes últimos anos. Com a crise financeira de 2010 a 2014, que teve início como parte da crise financeira global de 2007–2008, afetando principalmente os países europeus meridionais e a Irlanda, houve uma diminuição do número de máquinas a operar bem como das vendas, mas a partir do ano 2015 a situação reverteu e o panorama tem vindo a melhorar gradualmente, com crescimentos a cada ano, segundo o relatório de 2018 da EVA (EVA 2019a).

O negócio das máquinas de *vending* representa uma fonte rápida e económica de obtenção de produtos alimentares, uma solução eficaz para empresas que estão fora de centros urbanos, empresas que não têm serviço de refeitório, que trabalham 24 sobre 24 horas ou que apenas pretendem satisfazer as necessidades dos seus colaboradores. É um serviço que se encontra alocado em vários locais, sendo que no nosso país, 80% encontra-se nos locais de trabalho e os restantes 20% nos locais públicos à semelhança do que acontece no resto da Europa. É um serviço acessível a uma vasta gama de utilizadores e dados de 2018 da Eva, reportam que o mercado português continua dominado pelo café expresso com 100% das máquinas de café sendo as máquinas dispensadoras de bebidas quentes.

De acordo com estudos relativos ao comportamento dos consumidores, assistimos a uma diminuição da utilização das máquinas semi-automáticas de bebidas quentes de balcão pelas máquinas automáticas dispensadoras de bebidas quentes e a troca dos solúveis, pelo café em grão e esta tendência prende-se com o investimento em equipamentos novos e de última geração que apesar de inflacionar preços, não fizeram diminuir as vendas. Em Portugal, são vendidos diariamente cerca de 1,18 milhões de produtos sendo que as bebidas quentes representam 79% do valor, as bebidas frias 9%, snacks 11% e produtos frescos, tais como sandes, 1%, isto traduziu-se numa receita de cerca de 117 milhões de euros, em 2018 (EVA 2019).

### **3. ENQUADRAMENTO DO VENDING NAS DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR**

As doenças alimentares são causadas pela presença de microrganismos patogénicos nos alimentos o que pode ocorrer em qualquer fase da cadeia alimentar, através de várias formas de contaminação: poluição na água, no solo, no ar e no armazenamento e transformação de alimentos inseguros (Organização Mundial de saúde [OMS] 2020). As doenças transmitidas por alimentos podem ser classificadas como intoxicações ou infeções.

As infecções são causadas pela ingestão de microrganismos viáveis, em dose infecciosa e pela reação do organismo à sua presença ou aos seus metabolitos. Como exemplo temos os *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*. A intoxicação é provocada pela ingestão de alimentos que contêm toxinas, pré-formadas, produzidas por microrganismos e são exemplos, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp. e *Listeria monocytogenes* (OMS 2020; Craveiro et al. 2018) . Os géneros *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e a espécie *Escherichia coli* enterohemorrágica, são as bactérias que atualmente mais afetam a população por via alimentar (OMS 2020). No caso da salmonelose os alimentos envolvidos são ovos e carne de aves e outros produtos de origem animal. A campilobacteriose está associada ao consumo de carnes de aves mal cozida, leite não pasteurizado e água não potável e no caso das doenças causadas por *Escherichia coli*, estão envolvidas as frutas, vegetais frescos, leite não pasteurizado e carne mal cozida (OMS 2020).

Até ao momento existe apenas um relato relacionado a intoxicação alimentar provocada pelo consumo de bebidas provenientes de máquinas dispensadoras. Foi o caso reportado por Nelms e outros investigadores (1997), que estudaram uma intoxicação alimentar causada por *Bacillus cereus* numa fábrica em Minneapolis, em que os funcionários apresentaram sintomas de vômitos e náuseas uma hora depois de terem bebido chocolate quente dispensado de uma máquina de venda automática localizada na fábrica. Concluíram que a máquina era limpa semanalmente com lavagens automáticas, mas a mistura não teria sido removida, o que levou a uma acumulação de resíduos. A análise laboratorial das bebidas dispensadas identificou  $1,7 \cdot 10^5$  UFC (unidades formadoras de colónias) /g de *B. cereus*. O microrganismo foi também encontrado dentro e ao redor do copo do misturador onde ocorre a mistura do chocolate em pó com a água. Este estudo determinou que os esporos presentes na bebida poderiam ter germinado e multiplicado dentro da máquina quando expostos a água quente por longos períodos.

#### **4. OBJETIVOS**

De acordo com o Livro Branco sobre a Segurança dos Alimentos, a recolha e a análise de informações, bem como os pareceres científicos, são elementos fundamentais da política de segurança dos alimentos, revestindo-se de particular importância para a identificação de potenciais perigos para a alimentação humana e animal. Os métodos e indicadores utilizados para identificar problemas são variados. Podem incluir dados provenientes de controlos realizados ao longo da cadeia alimentar humana e animal, das redes de vigilância de doenças, de investigações epidemiológicas e de análises laboratoriais. Dado que a indústria que nos propusemos estudar, está em expansão, abrangendo vários setores, tais como hospitais, lares de idosos e escolas, onde existem grupos de risco, e os equipamentos apresentam manutenção manual e periódica, o conhecimento sobre os perigos a que os produtos do

*vending*, nomeadamente as bebidas quentes, estão sujeitos, permite uma melhor identificação das causas e apresentar melhorias ao plano HACCP aplicável.

O objetivo principal do presente estudo, foi inspecionar as máquinas automáticas dispensadoras de bebidas quentes de acordo com a *check list* definida pela empresa, e pesquisar a presença de microrganismos potencialmente patogénicos. Pretendeu-se ainda avaliar o potencial de patogenicidade desses microrganismos, através da análise da capacidade de formação de biofilmes, resistência a antibióticos e atividade hemolítica. Secundariamente, analisamos a correlação entre os resultados das inspeções e os microbiológicos.

O estudo foi efetuado numa empresa de *vending* que se dedica à produção, embalagem e distribuição de bens alimentares, que solicitou ser mantida no anonimato.

A empresa atua transversalmente em vários segmentos de atividade abrangendo os mais diversos consumidores e destacam-se três grandes áreas de atuação: produção e embalamento de alimentos, compra e venda de produtos alimentares e distribuição através de máquinas automáticas. Presta serviços nos mais variados setores: indústria, escritórios, hospitais, universidades, e instituições públicas. O crescimento sustentado e a vasta experiência fazem com que seja reconhecida como uma das empresas líderes do setor. Conta neste momento, com cerca de 500 organizações a nível nacional. O número de máquinas de *vending* passou nos últimos anos de 200 para 4500 unidades. Até ao momento, existem cerca de 1338 máquinas automáticas dispensadoras de bebidas quentes distribuídas pelos distritos de Santarém, Lisboa e Setúbal.



## **II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1. CONSIDERAÇÕES GERAIS ACERCA DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS**

#### **1.1. Microrganismos e sua relação com os alimentos**

Os microrganismos são um conjunto de seres vivos de tamanho microscópico, que habitam de forma ubíqua nos vários ecossistemas (animais, plantas, solo, água e ar). Estes possuem uma grande diversidade de formas, tamanho, habitat e funções. Os alimentos constituem um habitat ótimo para o desenvolvimento de microrganismos pela sua riqueza em nutrientes, água e pH favorável, fatores fulcrais ao seu crescimento e multiplicação. São exemplo de microrganismos as bactérias, fungos, protozoários, vírus e leveduras. Todos os microrganismos possuem condições específicas de temperatura, humidade, pH, atmosfera gasosa envolvente e de nutrientes para alcançar o seu desenvolvimento ótimo (velocidade máxima de multiplicação). Assim, o conhecimento dos fatores que potenciam e/ou inibem o seu crescimento possibilita uma atuação no sentido de controlar o seu crescimento nos alimentos (Craveiro et al. 2018).

#### **1.2. Formação de biofilmes**

A presença de biofilmes é comum na indústria alimentar, encontrando-se em todos os tipos de superfícies existentes nas linhas de processamento de alimentos, desde plástico, vidro, metal e madeira, até aos próprios produtos alimentares. Os biofilmes formados nessas superfícies são a principal causa de contaminação do produto final, tendo como consequências a rejeição do produto, perdas económicas e até mesmo doenças caso estejam envolvidos agentes patogénicos alimentares (Rodrigues et al. 2012). Caso não haja implementação de sistemas de qualidade eficientes e aplicação efetiva de agentes de limpeza, os microrganismos podem não ser completamente removidos das superfícies que entram em contacto com os alimentos (Oliveira et al. 2006). As máquinas de *vending*, pelo seu grau de automação, podem ficar sem manutenção durante dias, levando à acumulação de resíduos alimentares nos equipamentos em contacto com as bebidas.

##### **1.2.1. Definição**

Um biofilme é constituído por uma comunidade microbiana séssil, caracterizada por apresentar células que aderem irreversivelmente a um substrato, interface ou uma à outra, e que estão envolvidas por uma matriz extracelular de substâncias poliméricas que produzem e exibem fenótipos específicos ao nível do crescimento e da transcrição de genes (Costerton et al. 1995; Donlan 2002). Os biofilmes, para além de causarem problemas consideráveis de contaminação cruzada e de contaminação pós-processamento dada a sua remoção difícil e resistência a produtos de limpeza e desinfeção, (Flach 2005; Rodrigues et al. 2012), apresentam elevada resiliência no tratamento com antibióticos. Os mecanismos genéticos envolvidos na resistência parecem recair em duas classes gerais: fatores de resistência inatos

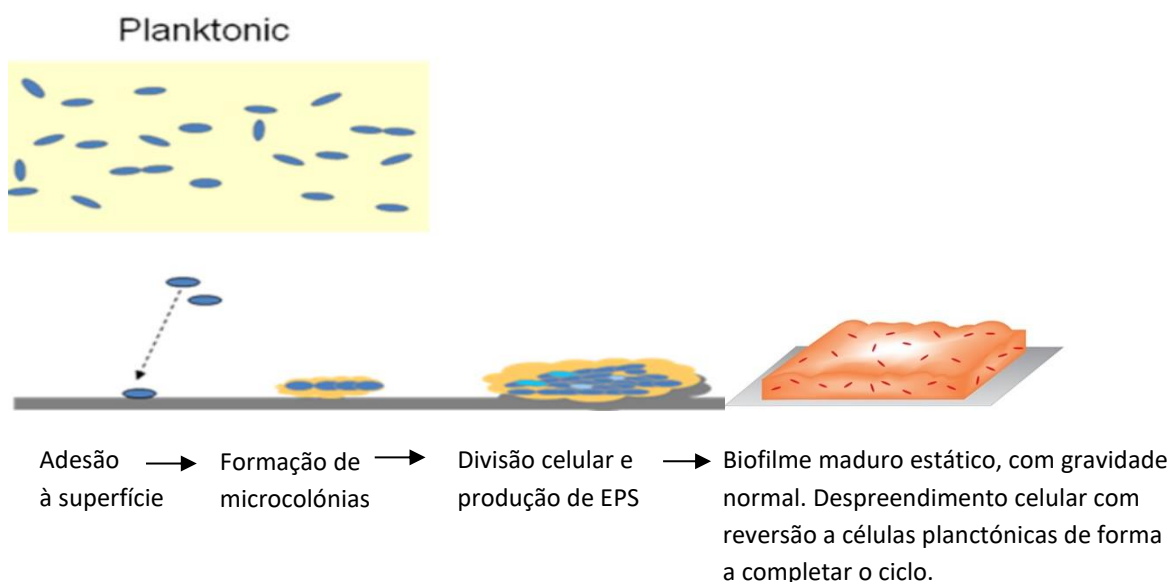
e fatores de resistência induzidos (Stewart & William Costerton 2001). Os mecanismos inatos são ativados como parte da via de desenvolvimento do biofilme; incluem a diminuição da difusão de antibióticos através da matriz, diminuição da disponibilidade de oxigênio e nutrientes acompanhada por alteração da atividade metabólica. Os fatores de resistência induzidos incluem os resultantes da indução pelo próprio agente antimicrobiano (Anderson & O'Toole, 2008). Algumas das espécies bacterianas referenciadas na indústria alimentar são, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (Galié et al. 2018; Lequette et al. 2010).

### 1.2.2. Composição

Os biofilmes são constituídos por microcolônias agregadas de diferentes espécies de microrganismos. Esses microrganismos representam cerca de 15% do volume e a matriz ocupa cerca de 85% do mesmo (Costerton et al. 1995; Donlan 2002; Kokare et al. 2009) O principal elemento dessa matriz são os exopolissacarídeos (EPS), que são responsáveis pela morfologia, coesão e integridade funcional. Esta matriz é também composta por proteínas (incluindo enzimas), íons, lípidos, ácidos nucleicos (DNA, RNA), fosfolípidos, glicoproteínas e água (Sutherland 2001; Vasudevan 2014). São todos estes componentes no seu conjunto que fazem dos biofilmes estruturas celulares altamente resilientes (Vasudevan 2014).

### 1.2.3. Etapas de formação

As etapas que levam à formação do biofilme são possíveis de visualizar na Figura 1.



**Figura 1 - Representação esquemática das etapas de desenvolvimento de biofilmes (adaptado de Vasudevan, 2014 e Kim et al 2013).**

O processo de formação de um biofilme inicia-se com a adesão de células livres, neste caso, bactérias, a uma superfície sólida, biótica ou abiótica e posterior fixação. Numa segunda etapa dá-se o crescimento e divisão das células que sofreram a adesão inicial. Surge a produção de EPS, e por isso, a adesão passa a irreversível e firme. A etapa seguinte, caracteriza-se por um precoce desenvolvimento da arquitetura do biofilme, com formação de microcolónias (Donlan 2002; Vasudevan 2014). As bactérias ao se desenvolverem no interior da matriz e formarem EPS, emitem sinais químicos que lhes permitem comunicar com as restantes e multiplicarem-se, um processo designado por *quorum sensing* (Jamal et al. 2015). Na quarta etapa é possível visualizar um biofilme maduro, que apresenta canais de água. É aqui que a maior parte das bactérias altera os seus processos fisiológicos para se adaptar às condições do seu novo 'habitat' (Vasudevan 2014; Stoodley et al. 2002). No entanto, à medida que os biofilmes crescem em tamanho, as células que residem nas camadas mais íntimas do biofilme podem não ter acesso a nutrientes ou podem sofrer de acumulação de resíduos tóxicos; portanto, o seu microambiente pode tornar-se desfavorável. Além disso, se as condições ambientais mudarem, a residência num biofilme pode tornar-se arriscada. Em qualquer um destes casos, as bactérias devem ser capazes de detetar e responder às condições ambientais desfavoráveis retornando ao modo de existência planctónico. Assim, prevê-se que a última etapa, a dispersão de biofilmes, deve ser um processo altamente regulado que envolva muitos circuitos sensoriais (Karatan & Watnick 2009).

#### **1.2.4. Fatores que influenciam a formação**

O tipo de superfície e as proteínas à superfície dos microrganismos, desempenham um papel importante no processo de adesão (Vadusevan 2014) e o crescimento e a atividade bacteriana, são substancialmente melhorados em superfícies às quais os microrganismos se podem anexar (Kokare et al. 2009). Existe uma interação hidrofóbica que ocorre entre a célula e a superfície, capaz de superar as forças repulsivas (Teixeira & Rodrigues 2015), por isso os microrganismos aderem mais facilmente a superfícies hidrofóbicas, como é o exemplo dos plásticos e silicones, do que a superfícies hidrofílicas como metais e vidros (Kokare et al. 2009).

Relativamente às características físico-químicas do meio aquoso, tais como pH, nível de nutrientes, força iónica e temperatura, estes fatores podem desempenhar um papel importante na taxa de adesão microbiana às superfícies (Kokare et al. 2009; Prakash et al. 2003). Alguns estudos afirmam que a formação de biofilmes é maior em condições de crescimento perto das de crescimento microbiano ótimo (Rode et al. 2007). Relativamente ao pH, os biofilmes formam-se a valores próximos da neutralidade e a alteração para valores inferiores ou superiores vai afetar a formação dos mesmos, tal acontece porque o pH tem um efeito determinante no metabolismo microbiano. Além disso, sabe-se que interfere nas

propriedades eletrostáticas dos mesmos, podendo alterar a repulsão e dificultar o processo de adesão às superfícies (Prakash et al. 2003).

Relativamente às características dos microrganismos, existe uma série de fatores a ter em consideração. Estruturas celulares como fímbrias, proteínas, lipopolissacarídeos (LPS), EPS, e flagelos, desempenham um importante papel no processo de adesão. Polímeros na superfície celular com locais não polares como fímbrias, outras proteínas e componentes de certas bactérias Gram-positivas, parecem dominar a ligação aos substratos hidrofóbicos, enquanto que EPS e LPS são mais importantes na ligação aos materiais hidrofílicos (Donlan 2002).

### **2.3. Resistência a antibióticos**

Um dos mecanismos adotados para o tratamento das toxinfecções alimentares tem sido a terapia antibiótica, e apesar do incontestável efeito positivo na saúde pública, o seu uso tem levado ao aparecimento e disseminação de resistências por parte de microrganismos potencialmente patogénicos (Hashempour-Baltork et al. 2019). Os principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos são: a modificação ou destruição enzimática do antibiótico (eg., destruição dos agentes beta-lactâmicos pelas beta-lactamases); prevenção da acumulação intracelular do antibiótico através da redução da permeabilidade celular a este (eg., resistência de *P. aeruginosa* ao imipenem) ou existência de bombas de efluxo de antibióticos das células bacterianas (eg., resistência da família *Enterobacteriaceae* às tetraciclínas); alterações nas moléculas alvo dos antibióticos (eg., resistência intrínseca de *Enterococcus* spp. às cefalosporinas), e a produção de moléculas alvo alternativas que não são inibidas pelo antibiótico, enquanto a produção das originais persiste (eg., resistência de *Staphylococcus aureus* à meticilina). Sabe-se que a disseminação destas resistências pode ser veiculada por alimentos e através do perfil de resistência dos microrganismos isolados a antibióticos comuns, constatou-se que a microbiota alimentar não está separada da sua contraparte humana e a transferência conjugal de genes de resistência acontece quer *in vitro* como *in vivo* (Teuber 1999). O uso imprudente de antimicrobianos na produção de alimentos, incluindo pecuária, aquicultura, produção agrícola e o uso de desinfetantes e biocidas através da cadeia alimentar, pode contribuir ainda mais para o aumento e disseminação da resistência (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura [FAO] 2020). Tendo em mente a magnitude do problema, a OMS divulgou em 2017, uma lista de microrganismos resistentes a antibióticos como prioritários. A lista consiste em 12 bactérias, que são classificados em três categorias de prioridade; crítica, alta e média. No patamar crítico temos, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos, sendo que nos últimos também se inclui a resistência a cefalosporinas de terceira geração. Como prioridade alta, *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina,

*Staphylococcus* resistentes à meticilina e resistência à vancomicina, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. resistentes a fluoroquinolonas e *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a fluoroquinolona e cefalosporinas de terceira geração. Por último, como prioridade média, *Streptococcus pneumoniae* não sensível à penicilina e *Haemophilus influenzae* resistente à ampicilina (WHO 2020b).

Portugal é, no contexto europeu, um país com um elevado consumo de antibióticos, apesar da diminuição desse consumo nos últimos anos (ECDC 2019). A resistência bacteriana tem crescido acentuadamente, e as bactérias Gram-positivas mais resistentes aos antibióticos são da espécie *Staphylococcus aureus* e do género *Enterococcus*, ao passo que as bactérias Gram-negativas mais resistentes aos antibióticos pertencem às espécies, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e à família *Enterobacteriaceae* (Loureiro et al. 2016). Definições como bactérias multirresistentes (MDR), extremamente resistentes (XDR) e *pandrug* resistentes (PDR) estão a ser utilizadas na literatura médica para caracterizar os diferentes padrões de resistência encontrados. As MDR apresentam resistência a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas, as XDR , apresentam resistência a pelo menos um agente em todas as categorias antimicrobianas e as PDR, foram definidas como tendo resistência a todos os agentes em todas as categorias antimicrobianas (Magiorakos et al. 2012).

#### **2.4. Capacidade hemolítica**

A patogenicidade é um termo geral que se refere ao potencial de um microrganismo para infectar. Várias características físicas e químicas das bactérias, como estruturas que facilitam a adesão a um hospedeiro ou moléculas que ajudam a ultrapassar as barreiras do hospedeiro, contribuem para a patogenicidade e conseqüentemente para a virulência (Willey et al. 2008). Um dos fatores de virulência estudados neste trabalho foi a capacidade hemolítica. A hemólise consiste na libertação de hemoglobina dos eritrócitos para o meio envolvente. A hemólise *in vivo* é um evento patogénico que ocorre sob a forma de anemias ou como resposta a intoxicações ou infeções. A hemólise *in vitro*, é utilizada como um método sensível e confiável para analisar a ação lítica nas membranas celulares e as membranas celulares de eritrócitos são usadas como modelo (Montes et al. 2008).

### **3. MICRORGANISMOS DE INTERESSE NO ÂMBITO DO ESTUDO**

Os microrganismos analisados nas máquinas dispensadoras de bebidas quentes pela empresa de *vending* onde o presente estudo foi efetuado, são aqueles que indicam a possibilidade de intoxicação alimentar, mas devido a questões relacionadas com a complexidade, a sensibilidade da deteção, o custo e a rapidez na obtenção de resultados, a análise microbiológica anual da água, superfícies e bebidas, não inclui a deteção de uma grande diversidade de microrganismos patogénicos. O ensaio microbiológico incluído na

verificação, na monitorização operacional e na vigilância, geralmente está limitado aos testes para microrganismos indicadores e é efetuada após o processo de higienização como forma de validar processos. Assim, os microrganismos totais são definidos como o número de microrganismos que existe num determinado produto alimentar em condições ótimas de cultura e os mesmos não se diferenciam entre levedura, bolor ou bactéria (Monteiro 2016) o que não permite correlacionar diretamente com a presença de toxinas ou de agentes patogénicos (Tortorello 2003). Alguns exemplos dos organismos que podem estar incluídos nestas análises, são: coliformes; *E. coli*; *Enterobacteriaceae*; *Listeria* spp. e leveduras e bolores (Tortorello 2003).

### **3.1. Bolores**

Bolores são fungos compostos por longos filamentos ramificados, denominados hifas, que formam o micélio (Crous et al. 2009). Embora a maioria dos bolores sejam aeróbios obrigatórios (requerem oxigénio livre para o seu crescimento), a sua exigência de crescimento ao nível de valores de pH é bastante ampla, variando de um pH igual a 2 até 9. A sua gama de temperaturas ótimas também é ampla (10-35 °C), com algumas espécies capazes de crescer abaixo ou acima desta gama (Valerie et al. 2001). Muitos fungos são capazes de se desenvolver com  $a_w$  superior a 0,8, enquanto alguns bolores xerofílicos (bolores que crescem com  $a_w$  inferior a 0,85) conseguem desenvolver-se a valores de  $a_w$  tão baixos como 0,65 (Jay et al. 2008). A capacidade destes organismos surgirem nos alimentos deve-se, em grande parte, às suas exigências ambientais relativamente versáteis, como referido, e pela transmissão dos seus esporos por via aquática, aérea e através de vetores como os insetos. Estão geralmente associados à deterioração de alimentos ácidos, açucarados, fermentados ou com  $a_w$  baixo (Saraiva et al 2019).

Como já foi referido, o maior problema que limita o tempo de vida de prateleira de produtos com humidade elevada e intermédia é o crescimento de bolores, mas também podem causar reações alérgicas e problemas respiratórios. Vários fungos alimentares, e possivelmente leveduras, podem ser perigosos para a saúde humana ou animal devido à sua capacidade de produzir metabolitos tóxicos conhecidos como micotoxinas (*United States Department of Agriculture [USDA] 2013*). A maioria das micotoxinas são compostos estáveis que não são destruídos durante o processamento de alimentos ou tratamento térmico. Mesmo que os organismos geradores não sobrevivam à preparação dos alimentos, a toxina pré-formada ainda pode estar presente. Certos bolores e leveduras alimentares também podem provocar reações alérgicas ou causar infeções. Embora a maioria dos fungos alimentares não sejam infecciosos, algumas espécies podem causar infeções, especialmente em populações imunocomprometidas, tais como indivíduos idosos e debilitados ou infetados com HIV (Vírus

da Imunodeficiência Humana), e pessoas que realizam tratamentos de quimioterapia ou antibioterapia (Valerie et al., 2001).

Como aparecem disseminados no meio ambiente e nos produtos de origem vegetal, podem ser transferidos para os alimentos, por contacto com equipamentos contaminados ou por exposição ao ar, podendo ser contaminantes de ingredientes utilizados na preparação de alimentos ( Saraiva et al. 2019). Estudos anteriores revelaram a sua capacidade para aderir e formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, sendo *Aspergillus fumigatus* uma das espécies que apresentam essa capacidade (Ramage et al. 2009).

### **3.2. Leveduras**

Fungos unicelulares em contraste com os bolores, que são multicelulares. São anaeróbias facultativas e podem crescer numa vasta gama de pH ácido (Jay et al. 2008). Uma levedura típica apresenta células ovais, que se multiplicam assexuadamente por gemulação ou cissiparidade. Como células simples, as leveduras crescem e reproduzem-se mais rapidamente do que os bolores. Também são mais eficientes na realização de alterações químicas, por causa da sua maior relação área/volume. A maioria das leveduras, não vive no solo, mas adaptou-se a ambientes com alto teor de açúcares, como o néctar das flores e a superfície de frutas. A deterioração por leveduras ocorre, principalmente, em produtos com humidade intermédia a alta. A contaminação destes produtos resulta, normalmente, de utensílios e equipamento inadequadamente higienizados. Deste modo, ao manter as BPF, a contaminação por estes microrganismos será minimizada (Rosário 2013; Spencer 2004). Níveis de leveduras superiores a  $10^6$  UFC/g podem conferir uma alteração de sabor ao produto e níveis entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/g, podem causar deterioração devido à produção de ácido e de gás (Saraiva et al. 2019). Ao contrário de bactérias e vírus, as leveduras raramente são associadas a surtos de gastroenterite alimentar, intoxicação ou outras infeções, mas algumas espécies como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* são patogéneos oportunistas que causam várias infeções ao nível dos sistemas respiratório, cutâneo, mucocutâneo, sistema nervoso central e de órgãos (Hazen KC & Howell 2003). Alguns estudos com *C. albicans* (Ramage et al 2005) e *S. cerevisiae* demonstraram a sua grande capacidade para formar biofilmes, e no caso da *S.cerevisiae*, com o objetivo de melhorar as características organoléticas de produtos alimentares (Zara et al. 2020)

### **3.3. Bacillus cereus**

*Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva e anaeróbia facultativa. Tem forma de bacilo, é catalase positiva, formadora de esporos e móvel. A temperatura ótima de crescimento situa-se nos 30 °C, mas o intervalo pode ir desde os 10 °C até aos 48 °C (Goepfert et al. 1972). Causa dois tipos diferentes de intoxicação alimentar: o diarreico e o emético (Granum & Lund 1997). A intoxicação do tipo diarreico é causada por enterotoxinas

complexas (Beecher & Wong 1997), produzidas durante o crescimento vegetativo de *B. cereus* no intestino delgado, enquanto que a toxina emética é produzida por células de crescimento nos alimentos e designada de cereulida sendo resistente ao calor, proteólise e valores extremos de pH (Griffiths & Schraft 2017; McDowell et al. 2020). Para ambos os tipos de intoxicação, os esporos sobreviventes ao tratamento térmico são os responsáveis. Dado que os esporos de *B. cereus* são hidrofóbicos, esta propriedade favorece a formação de biofilmes nas superfícies de contacto com alimentos, sendo a sua remoção difícil através dos procedimentos habituais de higienização. Para além disso, a pasteurização, não é suficiente para a eliminação deste agente patogénico uma vez que os esporos são termorresistentes (Hilliard et al. 2003). A intoxicação alimentar por *B. cereus* é subnotificada, uma vez que ambos os tipos de doenças são relativamente leves e geralmente duram menos de 24 h (McDowell et al. 2020). *B. cereus* é um saprófita comum do solo e é facilmente transmitido para muitos tipos de alimentos especialmente de origem vegetal, mas também é frequentemente isolado de carne, ovos e produtos lácteos (Viegas 2010). É o que mais tem sido identificado em máquinas dispensadoras de bebidas quentes. Hall e colegas (Hall et al. 2007), identificaram *B. cereus* no chocolate quente dispensado de máquinas automáticas, e Bovermann em 2017, direccionou o seu estudo ao leite, tendo chegado à conclusão de que havia *B. cereus* nas bebidas e pelo menos uma das duas enterotoxinas capazes de provocar doença. Estudos sobre a capacidade de formação de biofilme em superfícies da indústria alimentar sob várias condições de temperatura, fontes de carbono (nutrientes) e NaCl, revelam maior formação em materiais como aço inoxidável e a temperaturas de 30 °C, com adição de meio TBS (Tryptone Soya Broth), condições tipicamente ligadas à indústria alimentar (Kwon et al. 2017). Tanto na interface ar-líquido, como em condições de submersão (tanques e tubos de aço inoxidável), a motilidade flagelar está envolvida no desenvolvimento de biofilmes (Hayrapetyan et al. 2015). Relativamente a estudos sobre resistência antimicrobiana de isolados de *B. cereus* provenientes de alimentos, nomeadamente de origem vegetal, apontam para suscetibilidade a várias classes de antibióticos, tais como, ciprofloxacina (99,3%), cloranfenicol (98,6%), amikacina (98,0%), imipenem (93,9%), eritromicina (91,8%), gentamicina (88,4%), tetraciclina (76,2%) e trimetoprima -sulfametoxazol (52,4%) e maior resistência a antibióticos do grupo dos beta-lactâmicos, como a penicilina e cefotaxima (100%), e à combinação amoxicilina+ácido clavulânico e ampicilina (99,3%) (Fiedler et al. 2019).

### **3.4. *Enterococcus* spp.**

Os microrganismos pertencentes a este género são cocos Gram-positivos, podendo apresentar-se isoladamente, aos pares ou em pequenas cadeias. São catalase negativos e não formam esporos. São anaeróbios facultativos, e capazes de crescer em condições bastante variadas de temperatura (10 - 45 °C) e de pH (5,0 - 9,6) (Facklam et al. 2002). Os



enterococos são considerados, entre as bactérias não-esporuladas, as mais termo-tolerantes (Franz et al. 2003), como consequência, esta característica torna-se muito importante, pois podem resistir aos processos de conservação dos alimentos, como pasteurização e fermentação (Franz et al. 2003; Houben 2003) e servir como indicadores da qualidade sanitária do alimento (Giraffa 2002). Apesar de serem bactérias comensais e possuírem algumas características úteis para a indústria alimentar em termos organoléticos e como probióticos e têm sido descritos nos últimos anos como patogênicos oportunistas, em que as espécies *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* são responsáveis pela grande maioria das infecções em seres humanos (Lima et al. 2020). Os enterococos podem causar intoxicação alimentar pela produção de amins biogênicas em produtos fermentados (Giraffa, 2002) e a patogenicidade está associada à presença de vários fatores de virulência e resistência a antibióticos (Santos 2011).

Entre os fatores de virulência associados aos enterococos, são considerados de grande importância: gelatinase (GelE), substância de agregação (Agg), proteína de superfície enterocócica (Esp), citolisinas (Cyl) e outras adesinas (Mannu et al. 2003; Semedo et al. 2003a). As hemolisinas são também referidas como citolisinas (Cyl), devido ao amplo grau de ação celular (Franz et al. 2001; Semedo et al. 2003b) e tem sido demonstrado que a sua produção contribui para a severidade da doença em grande número de modelos animais e em humanos (Semedo et al. 2003b). Por outro lado, Esp, Epa, GelE, Agg, parecem estar envolvidas no processo de produção de biofilme por parte de *E. faecalis* e *E. faecium*, provenientes de matrizes alimentares como leite, vegetais e carne (Marinho et al. 2013; Mohamed et al. 2004; NEClidoVá et al. 2009). O fato das proteínas mencionadas anteriormente poderem estar ausentes nas estirpes produtoras de biofilme parece ser a razão para a variabilidade na produção de biofilme nestas espécies, sendo que vários estudos reportam que *E. faecalis* produz mais biofilme que *E. faecium* (Mohamed et al. 2004; Soares et al. 2014).

Existem fortes evidências epidemiológicas de uma ligação entre a utilização de antibióticos na medicina humana e produção animal, com o aparecimento, disseminação e persistência de estirpes resistentes em produtos de origem animal (Bogaard & Stobberingh, 2000). Devido à sua capacidade mutagênica e adaptativa, estes microrganismos desenvolvem e adquirem novas resistências, através de mutações cromossômicas ou por transferência de genes. Os glicopéptidos, são a classe de antibióticos mais utilizada no tratamento de infecções causadas por estes agentes, e dentro das resistências adquiridas a antibióticos, os enterococos com resistência à vancomicina (VRE) tornaram-se, desde a década de 80, a preocupação mais séria em infecções clínicas humanas (Giraffa 2002), estando referenciada pela OMS como sendo de prioridade elevada e tem vindo a ser monitorizada desde então. Na UE, desde 2015, a percentagem de resistência a este

antibiótico, tem vindo a diminuir, exceto para *E. faecium* (ECDC 2019), mas por outro lado, tem-se verificado aumento da resistência a aminoglicosídeos (e.g., gentamicina, estreptomicina) em particular da espécie, *E. faecium*. Em Portugal, a resistência aos aminoglicosídeos, tem vindo a diminuir gradualmente (ECDC 2019). Os enterococos exibem resistência intrínseca a outras classes de antibióticos tais como beta-lactâmicos, lincosamidas, trimetoprima-sulfametoxazol, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos de baixa concentração, portanto a resistência enterocócica pode ser superada combinando por exemplo, agentes ativos dirigidos à parede celular com um aminoglicosídeo (ECDC 2019). Outras opções de tratamento incluem agentes disponíveis que não têm uma aprovação específica para VRE, tais como, cloranfenicol, doxiciclina, ampicilina de alta dose ou ampicilina-sulbactam, nitrofurantoína (para infeções do trato urinário inferior) e ainda quinupristina-dalfopristina e linezolid, que surgiram como opções terapêuticas aprovadas para *E. faecium* resistente à vancomicina, sendo que no caso de *E. faecalis*, esta é naturalmente resistente à quinupristina-dalfopristina (Linden 2002; Mendes et al. 2002).

Relativamente a estirpes enterocócicas isoladas de matrizes alimentares, um estudo recente com amostras de carne de frango e peru, reportou resistência mais elevada à canamicina (98,96%), rifampicina (80,41%) e ampicilina (60,82%) e índices mais baixos à tetraciclina (9,27%), benzilpenicilina (8,24%), cloranfenicol (3,09%), gentamicina (2,06%) e estreptomicina (1,03%). Nenhum isolado foi resistente à vancomicina (Sanlibaba et al. 2018). Por outro lado, analisou-se o perfil de resistência de enterococos provenientes de amostras de água de diferentes origens (efluentes hospitalares, águas residuais humanas e de indústria agropecuária), chegando-se à conclusão de que as maiores percentagens foram para a resistência à tetraciclina (44%), a ciprofloxacina (18%) e a gentamicina (12%) (Arronches 2014). Em máquinas dispensadoras de água, Cardaci et al. (2017), efetuou análises a amostras de superfícies como a área dispensadora, bicos móveis e dispensadores de copos de quatro máquinas, e todas as amostras de superfícies excederam o limite de 50 UFC/cm<sup>2</sup> para *Enterococcus* spp., segundo o critério em vigor na Itália, país onde o estudo foi realizado. Uma das razões apontadas para esta ocorrência foi o facto de esta zona (área dispensadora) ser afetada pela contaminação externa e pelos resíduos que permanecem no interior.

### **3.5. *Staphylococcus* spp.**

As bactérias do género *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família Staphylococcaceae e anaeróbias facultativas, com maior crescimento sob condições aeróbias. Os estafilococos têm um diâmetro aproximado de 0,5 – 1,5 µm e por se dividirem em planos diferentes, quando vistos ao microscópio, aparecem na forma de cachos de uva (Cervantes-García et al. 2014). Estes microrganismos não formam esporos, contudo, são resistentes ao dessecamento, sendo disseminados por partículas de poeira presentes no ar e

nas superfícies (Santos et al. 2007). Sobrevivem a concentrações de NaCl entre 10% a 20% e em relação ao aw, o valor mínimo para crescimento é 0,86 (Medved'ová & Valík 2012). *S. aureus* multiplica-se a temperaturas compreendidas entre 7,0 e 47,8 °C, com temperatura ótima de 37 °C (Santos et al. 2007).

As toxinfecções alimentares associadas a estafilococos, são das mais frequentes e resultam da presença e ingestão de enterotoxinas produzidas por espécies coagulase positivas, nomeadamente *Staphylococcus aureus* (Kadarya et al 2014). Geralmente as estirpes de *S. aureus* são catalase positivas e oxidase negativas (Baird-Parker 1990), e produzem a enzima coagulase que constitui um dos fatores de virulência pelo fato de coagularem o plasma humano (Fior et al. 2014), mas também podem ocorrer isolados coagulase-negativos no género. (Fox et al. 1996). Os estafilococos produzem quatro variantes de hemolisinas: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ) e delta ( $\delta$ ) (Aarestrup et al. 1999). Uma das formas de distinguir a origem humana ou animal das estirpes, é pelo perfil hemolítico. Dentro dos estafilococos coagulase positivos, a maioria das estirpes de origem bovina são  $\beta$  hemolíticos (hemólise completa) e  $\alpha$  hemolíticos (hemólise parcial), sendo que este último ocorre a níveis mais variáveis, enquanto que as estirpes de origem humana apresentam na sua maioria  $\alpha$  hemólise (Aarestrup et al. 1999; Hummel et al. 1992). As toxinas são mais termo resistentes em géneros alimentícios do que em culturas laboratoriais, não sendo inativadas pela pasteurização ou tratamentos térmicos habitualmente utilizados no processamento dos alimentos (Hennekinne et al. 2012).

Os principais veículos de contaminação cruzada dos alimentos por *S. aureus* são as narinas e as mãos (Gräf & Mönius 1977). Diferentes géneros alimentícios têm sido implicados na intoxicação alimentar estafilocócica, incluindo leite, produtos de pastelaria com creme, queijos, produtos de charcutaria, saladas, refeições cozinhadas e produtos com ovos (Santana et al. 2010). No que respeita a máquinas automáticas de bebidas quentes, um estudo efetuado por Dakroub & Na'was, (2017), constatou a presença de *S. aureus* nos botões de seleção e *touch screen*, de quatro das cinco máquinas de café analisadas, e em máquinas dispensadoras de água, Cardaci et al. (2017), efetuou análises a amostras de superfícies críticas, e da mesma forma que identificou *Enterococcus* spp., também identificou *S. aureus* em todas as amostras, excedendo o limite de 50 UFC/cm<sup>2</sup>, segundo o critério em vigor na Itália, país onde o estudo foi realizado. Há estudos que reportam a sua presença na indústria alimentar em forma de biofilmes (Cervantes-García et al. 2014; Götz 2002). Embora as investigações realizadas sobre o tema tenham como base, aspetos clínicos, concluíram que no processo estão envolvidos dois polissacarídeos: a poli-N-acetilglucosamina (PNAG) e a adesina intercelular polissacarídea (PIA) e que a maioria das estirpes de *S. aureus* relatadas até agora, têm demonstrado possuir este conjunto de genes (Cramton et al. 1999), mas a sua expressão parece ser muito variável entre os estafilococos (Valle et al. 2003).

Ao nível de resistências antibióticas, algumas estirpes de *S. aureus* desenvolveram resistência à meticilina (MRSA) e a propagação global, aumentou o interesse para a saúde pública mundial em 2010 (Luna et al. 2010), mas segundo o último relatório da ECDC de 2018, as percentagens têm vindo a diminuir.

Uma das terapêuticas atualmente disponíveis para o tratamento de MRSA, compreende a tetraciclina e a rifampicina (combinadas) bem como a clindamicina, a linezolida e a trimetoprima -sulfametoxazol (TMP-SMX), embora o seu uso seja restrito em alguns países (Harris et al. 2018). Em isolados provenientes de matrizes alimentares, a incidência de MRSA é elevada (Feßler et al. 2011) e os níveis de resistência ao TMP-SMX são variáveis; um estudo efetuado em carnes de frango, porco e refeições prontas a comer, reportou 69,6% de resistência (Wang et al. 2014), enquanto que outro estudo com isolados provenientes de espécies suínas, avícolas e bovinas, demonstrou sensibilidade ao antibiótico em questão (Lee 2003). Relativamente a estirpes provenientes do leite de vacas com mastites, o perfil de sensibilidade mostrou ser elevado (Saidi et al. 2019), tal como acontece com a ciprofloxacina e a gentamicina, que para além de serem eficientes em mastites bovinas, também o são em isolados clínicos humanos (Jie & Sun 2009; Righter 1987).

### **3.6. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa e não produz esporos. Apresenta forma de bacilo com cerca de 2 µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro (Odonkor, 2013). É o organismo anaeróbio facultativo mais comum no intestino humano, é distinguido dos outros membros da família *Enterobacteriaceae* principalmente com base na sua capacidade de fermentar lactose e produzir indol, bem como pela capacidade de hidrolisar ureia. Esta bactéria desenvolve-se em atividade água mínima de 0,935, pH entre 4,0 e 9,0 e faixa de temperatura de 7 a 49,4 °C (Fotadar et al. 2005). É considerada indicadora de contaminação fecal em alimentos processados, todavia, a falha na deteção de *E. coli*, não garante a ausência de patogénicos entéricos (Mossel 1967; Silliker & Gabis 1976). A sua presença indica um incumprimento das BPH, cozedura insuficiente ou contaminação cruzada a partir de um alimento cru, manipuladores ou das superfícies em contacto com o alimento. Os alimentos mais envolvidos nas toxinfecções por este microrganismo são vegetais crus, leite não pasteurizado e carne sem tratamento térmico adequado (Batt 2014). A *E. coli* é também o indicador de contaminação fecal mais utilizado na monitorização da qualidade da água (Odonkor 2013). A maioria dos estudos descritos para a presença deste microrganismo nas máquinas dispensadoras, baseia-se na análise a máquinas dispensadoras de água e pesquisa de coliformes fecais e totais, sem especificar o género (Chaidez-Quiroz et al., 1999; Hunter & Burge, 1986). Recentemente, um estudo (Tan et al., 2016), identificou coliformes em 17 amostras de água (94,12%) e em amostras de superfícies, tais como, bicos móveis (76,47%) e

grelha de gotejamento (82,35%), de máquinas dispensadoras de água, e através de técnicas laboratoriais moleculares, concluíram pertencer às estirpes *E. coli* U 5/41 e *E. coli* O157:H7.

A maioria das estirpes não representa qualquer perigo para o seu hospedeiro, no entanto, algumas causam diarreia e são classificadas com base nos seus fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, quadros clínicos e serologia. Atualmente, *E. coli* enteropatogénicas (EPEC), *enterotoxigénicas* (ETEC), *enteroinvasivas* (EIEC) e *enterohemorrágicas* (EHEC), onde se inclui *E. coli* O157:H7, representam os principais grupos patogénicos associados ao consumo de alimentos (OMS 2018b). Os fatores de virulência das estirpes patogénicas incluem a produção de toxinas, capacidade em aderir intimamente à mucosa intestinal por um mecanismo de agregação mediado parcialmente pelo gene *eae* e a produção de hemolisina mediada pelo gene *hly*. A hemolisina é uma proteína que ajuda a induzir infeções extraintestinais e intestinais (Almeida 2013). Trata-se ainda de uma bactéria com potencial para formar biofilmes, nomeadamente em superfícies da indústria alimentar e associadas à preparação de carne bovina (Dourou et al. 2011). Um estudo revelou, que a adesão inicial de *E. coli* O157:H7 e desenvolvimento de biofilme nas superfícies, é potencializado pela presença de flagelos e fimbrias (tipo 1) (Van Houdt & Michiels 2010) e a temperatura também desempenha um papel no processo; outro estudo verificou o aumento do número de células aderentes e planctónicas de *E. coli* O157:H7, quando incubadas a uma temperatura de 15 °C durante 7 dias (Dourou et al. 2011).

Relativamente à resistência a antibióticos, dados da ECDC de 2019, revelam que a resistência de *E. coli*, desenvolve-se facilmente através de mutações, (como tem acontecido para a resistência à fluoroquinolona), ou através da aquisição de genes, como a produção de beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) e carbapenemases. As ESBLs são enzimas que conferem resistência à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos, incluindo cefalosporinas de terceira geração (ECDC, 2019). Os carbapenemos geralmente resistem ao efeito das ESBLs e por essa razão permanecem ainda como uma das poucas opções para o tratamento de infeções graves. Uma ameaça crescente é a resistência aos carbapenemos mediada por várias carbapenemases, que podem conferir resistência a praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos disponíveis. Os genes para carbapenemases estão frequentemente localizados em plasmídeos que podem ser comutados entre *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, e outras bactérias Gram-negativas (ECDC 2019).

### **3.7. *Pseudomonas* spp.**

O género *Pseudomonas* spp. é composto por bactérias em forma de bacilo, aeróbias móveis e Gram negativas. Oportunistas e ubíquas podendo ser isoladas do solo, da água, das plantas e dos animais. São microrganismos altamente versáteis, tolerantes a condições de baixo oxigénio e nutrientes e crescem em faixas de temperatura de 4 a 42 °C (Ochoa et al.

2013). Em humanos comportam-se como oportunistas, permanecendo nos tecidos quando há quebra das barreiras naturais ou perda da imunidade, embora possam em algumas ocasiões, fazer parte da microbiota normal de indivíduos sãos (Stehling et al. 2010). Devido à frequência com que está envolvida em doenças humanas, a espécie *P. aeruginosa* tem recebido maior atenção (Iglewski 1996).

Na indústria alimentar, a importância das pseudomonas está relacionada com a deterioração e encurtamento da vida útil de alguns alimentos tais como leite processado, vegetais crus, produtos de pastelaria e sumos não pasteurizados, podendo originar maus odores, viscosidade e mau sabor (Abdul-Mutalib et al. 2019). Foi isolada de superfícies como aço inoxidável, borracha, lascas de ferro e superfícies de contacto com alimentos (Zottola & Sasahara 1994). No que respeita a máquinas automáticas dispensadoras de bebidas quentes, não existem estudos, mas a sua presença tem sido reportada em máquinas dispensadoras de água. No estudo de Chaidez-Quiroz et al. (1999), constataram a presença de *P. aeruginosa* (23%) nos equipamentos acessórios de máquinas dispensadoras de água, como tubos e bicos dispensadores. Para além disso, foi avaliada a sua presença ao longo de três semanas consecutivas e estava presente em 2/3 das máquinas, ou seja, a sua presença aumentou sugerindo um estado não transiente e este facto pode ser devido à capacidade de formação de biofilmes nas tubagens. A capacidade de formação de biofilmes é a principal característica que permite que esta bactéria resista a esforços de descontaminação, resultando em mecanismos multifatoriais de tolerância (difusão restrita de moléculas, atividade fisiológica diferencial e indução de mecanismos genéticos), podendo resistir aos tratamentos com antibióticos, biocidas e às respostas imunes do hospedeiro (Harmsen et al. 2010). A adesão bem sucedida às superfícies, depende em grande parte da presença de adesinas tais como pili, flagelos, lipopolissacarídeos e alginato (Bucior et al. 2012; Lejeune 2003). Para além disso, a presença de flagelos funcionais permitem que supere forças eletrostáticas repulsivas que possam existir entre a superfície celular e a superfície do material (O'Toole & Kolter 1998) *P. aeruginosa* apresenta outros fatores de virulência, tais como, proteases, exoenzima S e exotoxina A, pigmentos, fosfolipase C, leucocidina, endotoxina que promove o aparecimento de febre e hemolisina termo-estável que é tóxica para macrófagos alveolares (Bomberger et al. 2009). Um fator de virulência em particular é a presença do gene *plchr*, que tem sido associado ao declínio da função pulmonar, e cujos substratos de eleição são a esfingomiéline e a fosfatidilcolina presente nas membranas celulares (Montes et al. 2008)

Já foi referido que a predominância e persistência de pseudomonas em alimentos e em superfícies de plantas de processamento de alimentos, está relacionada à capacidade de formar biofilme, o que aumenta sua resistência a condições adversas, incluindo vários tratamentos antimicrobianos (Møretrø & Langsrud 2017). Para além da resistência adaptativa resultante da formação de biofilmes, a resistência a antibióticos por parte das pseudomonas

pode resultar da aquisição de genes, presença de bombas efluxo e da baixa permeabilidade da parede celular (Pang et al. 2019). Os antimicrobianos que permanecem eficazes no tratamento, incluem algumas fluoroquinolonas (eg.; ciprofloxacina e levofloxacina), aminoglicosídeos (eg.; gentamicina, tobramicina e amikacina), alguns beta-lactâmicos (eg.: piperacillina-tazobactam, ceftazidima, cefepima, ceftolozano-tazobactam, ceftazidima-avibactam, imipenem, meropenem, doripenem) e polimixinas, mas a resistência a carbapenemos tem vindo a aumentar em vários países da UE (ECDC 2019). Segundo dados da ECDC de 2018, e Neves et al. (2011), estirpes de *P. aeruginosa* de origem clínica humana, têm demonstrado altos índices de resistência a carbapenemos e aminoglicosídeos, relacionados com a produção de metalobetalactamases (MBL), presença de metilase 16S rRNA RmtD, perda da porina OprD e elevada expressão de bombas de efluxo. Quatro sistemas diferentes de efluxo com atividade antibiótica, foram descritos na *P. aeruginosa*: *mexAB-oprM*, *mexXY-oprM*, *mexCD-oprJ* e *mexEF-oprN* (Poole 2001). Os genes, apesar de estarem presentes em todas as espécies, não são expressos a níveis elevados. O aumento da expressão pode resultar em mutações nos genes de regulação, como os *mexR* (Ziha-Zarifi et al. 1999). As MBL têm sido identificadas em amostras de água ambiental, podendo atuar como fonte de reservatório de genes de resistência através da água ou dos alimentos (Neves et al. 2014). Estudos com isolados de leite cru, demonstraram resistência ao imipenem e aztreonam (Meng et al. 2020). Outro estudo isolou pseudomonas de carne de vaca, peixe fresco e peixe fumado e concluiu que dos 204 dos isolados obtidos, 181 apresentaram multirresistência aos antibióticos testados, nomeadamente aztreonam (98,4%), ticarcilina+ácido clavulânico (51,4%), ticarcilina (50,4%), e em menor percentagem ao ceftazidima (6,9%) e imipenem (7,2%) (Benie et al. 2017).

#### **4. IMPORTÂNCIA DOS SISTEMAS DE CONTROLO ALIMENTAR NO VENDING**

Numa era de tecnologias alimentares em rápida mudança e crescente comércio global de alimentos, controlar os riscos alimentares ao longo de toda a cadeia assume um papel fundamental. Para enfrentar os complexos desafios emergentes do século XXI, os sistemas de controle alimentar precisam ser atualizados com os últimos desenvolvimentos, operar com base no conceito de análise de risco e harmonizar-se com padrões internacionais e melhores práticas desenvolvidas pelo *Codex Alimentarius* (Codex Alimentarius Commission [CAC] 2003). A segurança dos alimentos passa pela implementação de sistemas de gestão da segurança com base na prevenção dos perigos físicos, químicos e biológicos em toda a cadeia alimentar. Esta nova abordagem inclui a aplicação de Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Higiene (BPH), Boas Práticas de Fabrico (BPF), sistemas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP) ou outros sistemas de gestão da qualidade dos alimentos e sistemas de rastreabilidade/retirada de produtos do mercado. As BPA, as BPH e as BPF, são

consideradas os sistemas ou programas que constituem requisitos prévios da aplicação dos sistemas HACCP (CAC 2003; Comissão Europeia 2016).

As vendas automáticas encontram-se regulamentadas pelo Decreto-Lei nº 24/2014 de 14 de Fevereiro, 2014, (alterado pelo Decreto-Lei nº 47/2014, de 28 de julho), designadamente nos artigos 22º a 24.º e, no que respeita à distribuição de géneros alimentícios em máquinas de *vending (snack)*, aplica-se a legislação da venda a retalho destes produtos, nomeadamente, as regras de higiene constantes no Regulamento (CE) nº 852 do Parlamento Europeu, sendo que para a regulamentação da água utilizada no fabrico de produtos para consumo humano aplica-se o Decreto-Lei nº306/2007, (alterado pelo Decreto-Lei nº152/2017). O Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e Conselho de 29 de Abril de 2004, 2004, estabelece as regras gerais destinadas aos operadores de empresas do sector alimentar no que se refere à higiene de géneros alimentícios. Neste sentido, os operadores do sector do *vending* deverão garantir o bom funcionamento das máquinas e das viaturas que as abastecem, a sua higienização, a correta embalagem e rotulagem dos produtos, a rastreabilidade, os registos de temperaturas, os prazos de validade, entre outros aspetos integrantes dos princípios HACCP. No que respeita às máquinas automáticas, o abastecimento e higienização são efetuados manualmente e de forma periódica (depende do consumo da máquina) levando à heterogeneidade de resultados, por essa razão, as atividades de controlo e verificação são muito importantes.

#### **4.1. Verificação de procedimentos**

A realização de atividades de verificação tem como objetivo determinar se o sistema HACCP se encontra implementado de acordo com o estabelecido no plano HACCP (correta determinação dos pontos críticos de controlo (PCC), correta definição dos parâmetros e respetivos limites críticos de controlo, adequada monitorização, medidas corretivas necessárias implementadas) e se o plano HACCP em vigor se encontra eficazmente desenvolvido e implementado tendo em conta os atuais produtos e processos.

Para verificação da adequação do plano de higienização e da execução do mesmo, a empresa efetua um controlo a dois níveis:

- **Qualitativo**, através de uma verificação dos procedimentos de limpeza e desinfeção efetuados ou por inspeção visual (inspeção)
- **Quantitativo**, através de controlo analítico (microbiológico/químico)

Este controlo analítico foi estabelecido para superfícies críticas, tais como, mãos de manipuladores, água da rede e bebida pronta, com leite na sua constituição, e são efetuadas uma vez por ano a um equipamento/operador, por uma empresa externa.



#### **4.1.1. Controlo qualitativo-inspeção**

Em finais de 2016, foi introduzida na empresa em que se realizou o presente estudo, uma nova funcionalidade, a inspeção. Inspetores monitorizam o bom funcionamento das máquinas e realizam a verificação e correção dos procedimentos definidos em termos de garantia de qualidade, higiene e segurança alimentar. A inspeção é realizada fora do horário de abastecimento, tendo por base as “Regras de Abastecimento” (Anexo II) que serviram de base para o estabelecimento de pontos de controlo. Por cada “não conformidade” detetada e registada, o programa requer foto para poder prosseguir com a inspeção e para detalhar por escrito o motivo da “não conformidade” e qual o tratamento a seguir para correção. A cada ponto de verificação é dada uma percentagem de igual peso até perfazer os 100%.

#### **4.1.2. Controlo quantitativo-análises microbiológicas**

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 Novembro de 2005, alterado pelo Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão, de 5 de Dezembro de 2007, “a utilização de critérios microbiológicos deve fazer parte integrante da aplicação de procedimentos baseados no sistema HACCP e de outras medidas de controlo da higiene”, as quais são importantes na avaliação das condições de higiene dos manipuladores, superfícies e utensílios com que o alimento possa estar em contacto. Estas análises são importantes em quatro dos princípios do plano HACCP: na análise de perigos, na determinação de pontos críticos de controlo, no estabelecimento de limites críticos e no estabelecimento de procedimentos de verificação. Para cada tipo de indústria alimentar deve ser estabelecido um plano de amostragem microbiológica. Na empresa de *vending*, onde o estudo foi realizado, os ensaios microbiológicos são efetuados uma vez durante o ano, a todas as filiais e estão definidos para superfícies críticas, bebidas com leite, mãos de manipuladores e à água de fornecimento.

A legislação nacional é omissa para a maioria dos produtos confeccionados, uma vez que estes estão sujeitos a um tratamento térmico, abrangendo apenas as classes de produtos frescos, contudo, o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), sugere valores guia para alimentos inseridos no sub-grupo 1A, (reconstituídos a partir de um produto desidratado, exceto fórmulas desidratadas para lactentes), que é o caso das bebidas quentes, e para superfícies correspondentes à zona 1, que estão em contacto direto com o alimento durante a sua preparação, confeção e distribuição (Anexo IV). A interpretação dos resultados depende das UFC por grama ou mililitro na amostra analisada e/ou da deteção ou não deteção de microrganismos patogénicos e/ou toxina(s) e classifica-os em três níveis: “satisfatório”, quando o resultado analítico se encontra dentro dos valores previstos, ou seja, inferior ou igual ao valor máximo de referência (VMR); “questionável”, quando o resultado é superior ao VMR e inferior ou igual ao Valor Máximo Admissível (VMA), indicando probabilidade de falhas

nos processos e “não satisfatório” e “não satisfatório/potencialmente perigoso”, quando é superior ao VMA, indicando que há falhas nos processos (Saraiva et al. 2019).

## 5. CARATERIZAÇÃO DA MÁQUINA DISPENSADORA DE BEBIDAS QUENTES

As máquinas dispensadoras de bebidas quentes são concebidas para distribuir vários tipos de bebidas, desde chá, café, café com leite, chocolate e *cappuccino* e o seu funcionamento interno é bastante similar de modelo para modelo.

No ato do abastecimento ou instalação, os solúveis são retirados da sua embalagem inicial e armazenados em recipientes de plástico. Quando uma bebida é pedida, a quantidade pré-seleccionada de cada produto é dispensada no misturador através do bico de saída do respetivo depósito e o solúvel mistura-se com a água pré-aquecida que vem da caldeira, no misturador. A bebida é então dispensada para um copo, através de um tubo de silicone de curto comprimento. Ao copo, por sua vez, é adicionado o açúcar e a paletina. A água utilizada na preparação pode ser proveniente da rede hídrica ou de bidão (empresa). As etapas principais deste processo, estão exemplificadas no fluxograma da Figura 2.

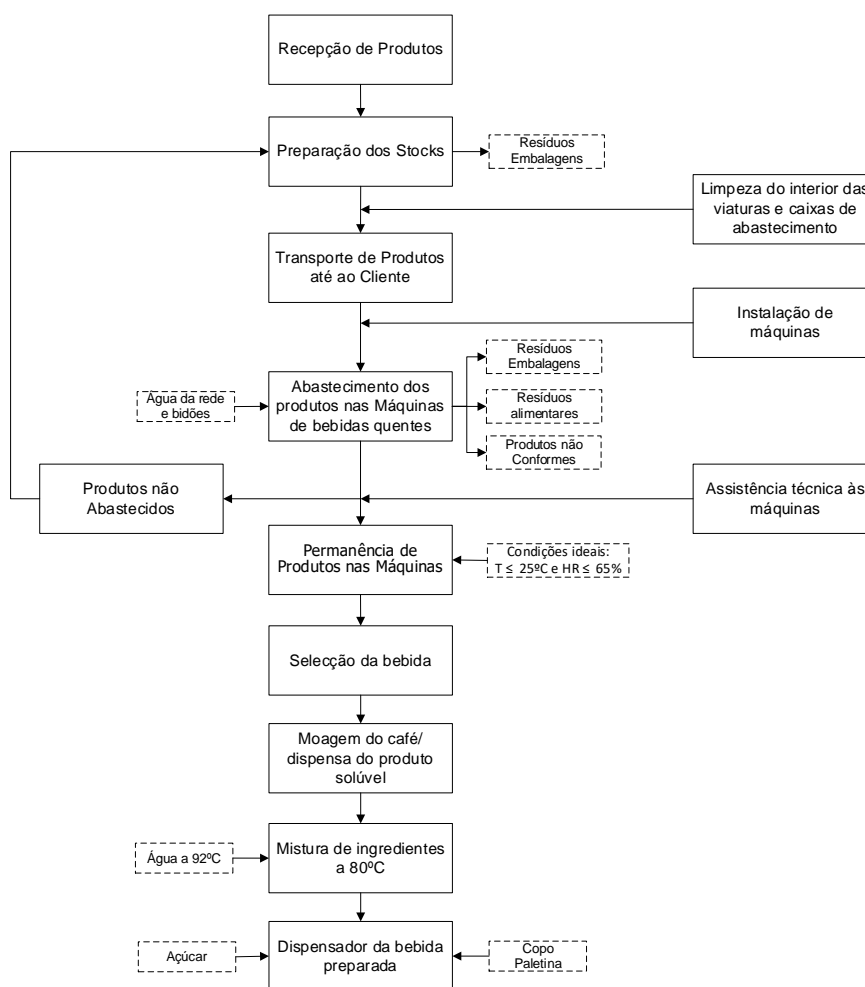


Figura 2 - Fluxograma do funcionamento da máquina dispensadora de bebidas quentes.

### **5.1. Abastecimento e inspeção**

De uma forma geral, o abastecimento tem início após a inspeção visual aos consumíveis (paletinas, copos, café, leite em pó, chocolate em pó, descafeinado, chá, entre outros). É dever do abastecedor verificar se estão em boas condições, sem presença de corpos estranhos e se é necessária a reposição. Antes de iniciar o abastecimento, deve aplicar nas mãos, a solução de álcool-gel, H5 *Soft Care Med* (Johnson-Diversey), desenvolvido para a desinfecção. Após abastecer os consumíveis e limpar restos de solúveis acumulados em zonas visíveis e não visíveis, com auxílio de um pincel seco, deve verificar o estado de limpeza e funcionamento dos misturadores. A seguir à limpeza, deve efetuar uma lavagem automática através do botão de programação. Na lavagem automática, a água proveniente da caldeira, passa pelos misturadores e circuitos de tubos e com auxílio de um pano descartável e pincéis (seco e húmido), o abastecedor efetua uma limpeza mais profunda com o objetivo de retirar a sujidade mais entranhada nas superfícies. Após enxaguamento, aplica um detergente desinfetante à base de tensoativos não-iónicos, D10 Suma Bac-Conc (Johnson-Diversey) nas superfícies, para remover a matéria orgânica e inorgânica, enxagua novamente e depois com auxílio de outro pano descartável seca muito bem. No final, deve efetuar uma prova, normalmente cappuccino, que apresenta na sua constituição os consumíveis leite, chocolate e café, de modo a atestar o bom funcionamento dos equipamentos e as condições organoléticas do produto final.

Na empresa onde se realizou o presente estudo, a realização da limpeza é manual, efetuada pelos próprios abastecedores. Devido à grande heterogeneidade de resultados que se podem obter, é requerida uma cuidada monitorização. Monitorizar o programa de limpeza, reduz custos em material e tempo, minimiza a contaminação ambiental, diminui as perdas por avarias e aumenta o tempo de vida útil dos produtos. Normalmente, a monitorização avalia a presença de resíduos, recorrendo a inspeção visual e de acordo com (Baptista 2003) uma elevada percentagem de intoxicações e infeções alimentares, resulta da contaminação dos equipamentos, o que reforça a noção da importância fundamental da higienização. As pessoas que entram em contacto direto ou indireto com os alimentos, devem manter um nível adequado de limpeza pessoal, e comportamentos e modos de operação adequados de forma a não contaminarem os alimentos por contaminação cruzada, quer devido a infeções bacterianas, quer virais. Os operadores envolvidos no processo de limpeza, devem receber formação em higiene pessoal e alimentar, para que sejam prevenidas as contaminações cruzadas dos alimentos, resultantes da disseminação da sua microbiota corporal, principalmente as que resultam dos microrganismos com uma dose infetante baixa, como *Escherichia coli* O157 H7 (Lelieveld et al. 2005). Para se realizar um programa de higienização com sucesso, é essencial conhecer a natureza da sujidade que vai ser removida, o tipo de superfícies que vão ser higienizadas, a qualidade da água, os métodos de higienização mais

adequados e utilizar agentes de limpeza e desinfecção compatíveis com a indústria alimentar. Um estudo analisou a carga microbiana presente no chocolate quente dispensado de uma máquina dispensadora e chegou à conclusão de que mantendo um protocolo de limpeza à base de detergente, é suficiente para baixar e manter a carga microbiana a níveis abaixo dos 3,4 log UFC/ml (Hall et al. 2007). É igualmente importante escolher o método mais indicado para avaliar e monitorizar a eficácia do processo implementado, o que permitirá não só detetar precocemente um problema, mas acima de tudo, evitar a sua perpetuação (Baptista & Antunes, 2005). A inspeção dos pontos de controlo, permite atestar se o equipamento está a trabalhar em condições e se o abastecedor está a implementar boas práticas de higiene segundo os planos de higienização (Anexo III) e as regras de abastecimento (Anexo II). Como resultado das várias inspeções efetuadas ao longo do tempo, tem-se verificado um padrão associado a “não conformidades”, que se traduz pela existência de restos de solúveis na base dos depósitos, nos misturadores e nos tabuleiros, levando a que se deteriore e ocorra desenvolvimento de fungos. Os dispensadores de copos também não são higienizados e pontualmente encontram-se solúveis com sinais de degradação, principalmente o leite em pó e o chá. As máquinas podem permanecer vários dias sem manutenção e nesse período, se não houver limpeza, o crescimento microbiano pode ocorrer, principalmente nos equipamentos adjacentes cuja manutenção é mais esporádica como no tubo dispensador (anual). O procedimento de inspeção regista e corrige no momento, mas é necessário que este seja mantido de forma consistente e eficaz. Na empresa onde o estudo foi efetuado, a formação na higienização dos equipamentos é dada *in loco* por supervisores, enquanto a formação em segurança alimentar é efetuada pelo responsável do departamento de qualidade. Estudos acerca das condições higio-sanitárias de máquinas dispensadoras de café e snack, demonstram que os operadores e supervisores, apresentam elevado conhecimento acerca dos planos de higienização (Raposo et al. 2015), mas pode ser que a falta de motivação e de tempo, sejam os fatores mais associados à ocorrência de “não conformidades” deste tipo. Os equipamentos em contacto direto com o alimento ou indiretamente com a boca do consumidor, bem como as matérias-primas, deverão ser alvo de maior atenção.

## **5.2. Permanência de produtos na máquina – leite em pó**

O leite em pó utilizado nas máquinas de *vending* é da marca *Ristora* e apresenta a designação leite em pó semi-granulado, sendo fornecido em embalagens de 500 g. É constituído por soro de leite em pó, xarope de glucose, leite em pó desnatado, gordura de coco não hidrogenada, açúcar, lactose, antiaglomerante E:551, estabilizador E:340ii e emulsionante E:471. Não contém glúten. A dose recomendada por bebida é de 6 a 8 g, quando combinada com café ou chocolate, e de 10-12 g quando simples. É utilizado como substituto do leite fresco e é considerado um produto microbiologicamente estável, pois apresenta um

aw entre 0,3-0,4, valor demasiado baixo para que ocorra o crescimento de microrganismos, contudo, depois de ser reconstituído com água, torna-se suscetível ao crescimento microbiano e deterioração como acontece com o leite fresco pasteurizado (Augustin et al. 2003). As condições ambientais como temperatura e humidade, os métodos de armazenamento e de preparação, são fatores importantes para garantir a qualidade microbiana do produto. Durante o armazenamento, a maior perda de qualidade é muitas vezes resultado da absorção de humidade pelo pó, que pode resultar em alterações químicas, físicas e/ou crescimento de bactérias e fungos (Al - Atrash 2019). As condições de armazenamento poderão influenciar também as características sensoriais do leite em pó, como a cor, o sabor e o cheiro através de reações de oxidação lipídica, cristalização da lactose e reações de *Maillard* podendo levar à rejeição por parte do consumidor (Matumoto-Pintro et al. 2017).

O leite em pó deverá ter uma cor uniforme, apresentar-se creme claro (devido ao tratamento térmico), não pode conter tonalidades amareladas, que acusem um produto reaquecido e o seu sabor e odor devem ser agradáveis e não rançosos, semelhante ao leite fluido, antes e após a sua reconstituição (Norma Portuguesa (NP) 1084 1987). Segundo a *United States Dairy Export Council* (USDEC), as condições ideais de armazenamento para produtos lácteos secos são temperaturas abaixo de 25 °C com humidade relativa abaixo de 65%. Devido à possibilidade de crescimento microbiano, impuseram-se limites microbiológicos ao leite em pó para *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* e estafilococos coagulase positivos (Regulamento (CE) 2073/2005 alterado pelo Regulamento 1441/2007 – Anexo V). Tanto os coliformes totais, como a *Escherichia coli*, são importantes indicadores no leite em pó uma vez que não são termorresistentes e sua presença indica um tratamento térmico claramente insuficiente ou uma contaminação posterior ao mesmo (Silva 2013) e outro dos microrganismos predominantes serão os formadores de esporos como os pertencentes ao género *Bacillus* (Augustin et al. 2003). Dado que nas máquinas dispensadoras a água deverá atingir temperaturas de pasteurização e a empresa de *vending* trabalha com fornecedores certificados, o controle microbiológico dos solúveis em pó, não está estipulado. A qualidade de todos os produtos derivados dos solúveis dependerá, basicamente, das condições microbiológicas do leite em pó, do estado de limpeza geral do interior da máquina, higiene pessoal dos operadores e condições de temperatura e humidade. Qualquer alteração do produto deverá levar à rejeição do mesmo.

### **5.3. Água de fornecimento**

Nas águas, a qualidade microbiológica está profundamente relacionada com a população microbiana que se encontra presente, assim como os seus metabolitos e as suas interações, contudo os perigos e riscos mais significativos para a saúde humana, continuam

a estar associados à ingestão de água contaminada com resíduos fecais de seres humanos ou outros animais de sangue quente (OMS 2018a) .

Anualmente, as entidades gestoras têm de elaborar um Programa de Controlo da Qualidade da Água (PCQA) que tem de ser aprovado pela entidade competente (artigo 14º do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto, alterado pelo DL 152/2017). O controlo da qualidade da água engloba controlos de rotina e controlos de inspeção, tendo uma frequência mínima de amostragens definida mediante o volume de água fornecida na zona de abastecimento (anexo II do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto, alterado pelo Decreto-Lei 152/2017). De acordo com o artigo 6º, anexo I e anexo II do presente decreto, com os controlos de rotina pretende-se obter de forma regular informações sobre a qualidade organolética e microbiológica da água, para avaliar a eficácia do tratamento. São avaliados parâmetros como *Escherichia coli*, bactérias coliformes, desinfetante residual, UFC a 22 °C e 37 °C, *Clostridium perfringens*, pH, cheiro e turvação. O controlo de inspeção tem como finalidade a verificação do cumprimento dos valores paramétricos fixados no referido Decreto-Lei, relativos a parâmetros microbiológicos, químicos e indicadores. Os dados da qualidade da água são publicados para consulta pública, e enviados à respetiva autoridade de saúde (artigo 17º do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto).

Não existem estudos relacionados com a presença destes microrganismos nas máquinas dispensadoras de bebidas quentes, mas sim em máquinas dispensadoras de água, e a contaminação por *P. aeruginosa* em águas minerais naturais pode ocorrer devido à presença natural desta bactéria na água retirada da fonte (Downes & Ito 2001) ou devido à contaminação durante o processo de engarrafamento, devido à característica de formação de biofilmes nas embalagens reutilizáveis e equipamentos da fábrica (Wingender & Flemming 2011) portanto, o mesmo se pode passar com as máquinas dispensadoras de bebidas quentes, através do uso da água da rede ou de furos e posterior enchimento dos bidões.

De facto, os sistemas de distribuição de água parecem ser bastante propícios ao desenvolvimento de biofilmes e estes permitem a manutenção dos microrganismos em condições viáveis e um local privilegiado para a sobrevivência de microrganismos patogénicos (Chaves 2004). Alguns dos microrganismos associados à sua formação neste tipo de sistemas são *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Batté et al. 2003), mas outros estudos detetaram fungos e protozoários (Chaves 2004). Outra questão associada com as águas de fornecimento é que estas podem constituir fontes de reservatório para genes de resistência antimicrobiana provocando disseminação e dificuldades na terapia de doenças (Neves et al. 2014) e também alterações de cor, sabor e odor características importantes na aceitação do produto final.

O procedimento para fornecimento de água nas máquinas dispensadoras de bebidas quentes pode ser uma de três vias: ou é inserido um bidão com capacidade de 20 a 30 litros,

cuja água pode ser proveniente da empresa de *vending* de onde as máquinas têm origem, pode ser obtida da empresa requerente do serviço sempre que seja autorizado pelo cliente, ou ainda, através da ligação à rede pública. Nestes dois casos, onde a água é proveniente de uma origem que não a da empresa de *vending*, toda e qualquer responsabilidade pela qualidade microbiológica e organolética da água, fica a cargo da empresa responsável pelo requerimento do serviço.

#### **5.4. Mistura de ingredientes- temperatura da água**

A literatura científica sugere que se devem confeccionar os alimentos de modo a que atinjam no seu centro térmico (interior) 70 °C durante pelo menos dois minutos (Mackey et al. 1990), ou que atinjam no seu centro térmico (interior) pelo menos 75 °C, condições que são suficientes para que sejam eliminadas bactérias como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* (Al Sakkaf & Jones 2012; Bolton et al. 2013; Coote et al. 1991). Contudo, as combinações tempo-temperatura utilizadas deverão ser validadas, para garantir a destruição de bactérias patogénicas.

Para o controlo de temperatura, as máquinas dispensadoras possuem uma sonda que monitoriza a temperatura da caldeira, que por sua vez é responsável pelo aquecimento da água. A temperatura a que a caldeira deve aquecer, é passível de ser programada pelos técnicos e o valor está estabelecido para 92 °C. Para zonas geográficas mais frias, deve ser estabelecida uma temperatura ligeiramente mais elevada (95 °C). Apesar do sistema de controlo ser bastante eficaz, a qualidade da água, nomeadamente a sua dureza, pode afetar o bom funcionamento da caldeira e da sonda, pela obstrução que os resíduos de calcário provocam. A leitura do valor da temperatura da sonda altera; quando lê acima do valor estipulado, o que sucede é a fonte da alimentação desligar e a máquina fica fora de serviço, mas quando lê abaixo, a caldeira pode aquecer a água a valores abaixo dos 92 °C. Esta anomalia poderá ser detetada aquando da visita de manutenção do técnico, através da inspeção visual aos componentes adjacentes, mas na maior parte dos casos, a deteção do problema acontece porque o cliente reporta que a bebida saiu fria.

Outro aspeto muito importante, é que uma vez chegada ao misturador, a água proveniente da caldeira já está a 80 °C ou menos (79,21 °C), fluindo de seguida pelo tubo dispensador. Desde o momento em que ocorre a mistura e o enchimento do copo, passam menos de 5 s, por isso o tempo de contacto com água a temperaturas de pasteurização no misturador, ocorre em menos de 2 s e no tubo, a temperatura da bebida decresce rapidamente até aos 70 °C/65 °C, o que representa, para alguns microrganismos termo tolerantes e produtores de esporos, a possibilidade de sobreviverem e se multiplicarem.

## 5.5. Tubo dispensador

O tubo dispensador é uma estrutura tubular, de silicone, com 1 cm de diâmetro e dependendo do modelo de máquinas, pode ter 15 a 20 cm de comprimento. O silicone é um material inerte, ou seja, não reage com químicos e é biocompatível e hipoalergénico o que o faz ser bastante utilizado no sector pediátrico e em implantologia. ( [Silicone Hoses and Silicone Tubings - Tubes International \(tubes-international.com\)](#)) Estas características estão de acordo com o Regulamento (CE) n° 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Outubro de 2004, que refere que qualquer material ou objeto destinado a entrar em contacto direto ou indireto com os alimentos, deve ser suficientemente inerte para excluir a transferência de substâncias para os alimentos em quantidades suscetíveis de representar um risco para a saúde humana ou de provocar uma alteração inaceitável na composição dos alimentos ou uma deterioração das suas propriedades organoléticas. Quando selecionamos uma bebida, o tubo dispensador funciona de veículo de passagem, que depois de preparada no misturador, passa e desemboca no copo através dos bicos móveis, e qualquer resíduo que fique no interior do circuito é uma suscetível fonte de contaminação (Raposo 2013).

Existem alguns estudos que avaliam a formação de biofilme em borrachas de silicone, a maioria relacionada com aparelhos próstéticos. Existe evidência da hidrofobicidade deste tipo de material e o estabelecimento de biofilmes de várias espécies de microrganismos. É o caso do estudo efetuado por Van der Mei et al. (2014) com estirpes de *Candida albicans* e *C. tropicalis* em combinação com diferentes estirpes de bactérias comensais e estirpes de *Lactobacillus*. Para além do tipo de material, o leite sendo um produto altamente nutritivo, é fonte de nutrientes para os microrganismos se desenvolverem e, o pH da bebida, apresenta valores próximos da neutralidade.

Sabe-se que as células em biofilme são até 1 000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos e estudos comparativos entre bactérias aderidas e bactérias planctónicas (as que não estão ligadas) mostraram que, quando os microrganismos se encontram ligados às superfícies, tornam-se mais resistentes aos produtos químicos (Joseph et al. 2001). De facto, observou-se que biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*, são cerca de 10 a 100 vezes mais resistentes aos desinfetantes usados na indústria alimentar do que células em estado planctónico (Rodrigues et al. 2012). Segundo o plano de higienização da empresa, o tubo dispensador é um equipamento cuja limpeza está indicada uma vez por ano, existindo evidência visual da acumulação de “resíduos”. Para além disso, outras zonas suscetíveis de acumular pó humedecido podem apresentar crescimento microbiano (Hall et al. 2007) e por contaminação cruzada contaminar o tubo. Assim, limpar e higienizar as superfícies que entram em contato com os alimentos são ações extremamente importantes para manter o controlo microbiológico e, desta maneira, impedir a contaminação dos alimentos.



## 5.6. Dispensador de copos

O dispensador de copos é o equipamento onde cai o copo quando uma bebida é selecionada e repousa pelo bordo por onde é ingerida. É considerada uma zona crítica porque o bordo do copo entra em contacto direto com o consumidor e na sua limpeza ocorre manipulação elevada por parte dos operadores e utilizadores, podendo ocorrer contaminação cruzada. No processo de limpeza, são utilizados pincéis, com o objetivo de retirar a sujidade mais entranhada. Estudos demonstraram que os panos e esponjas podem ser disseminadores importantes de microrganismos patogénicos, levando à contaminação cruzada dos alimentos (Rossi et al. 2013), portanto, os pincéis também podem desempenhar um papel na contaminação cruzada.

Os ensaios microbiológicos referentes às mãos dos manipuladores são efetuados à presença de estafilococos coagulase positivos, coliformes totais e *Escherichia coli*, e estes têm apresentado valores “aceitáveis” (não mostrado). Estudos acerca de análises efetuadas a mãos de manipuladores, antes da higienização, apontam para a presença de *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (41,7%) seguido por *Staphylococcus aureus* (29,2%) (Allam et al. 2016). A higiene das mãos é, por isso, muito importante, uma vez que este será o principal meio de contaminação dos alimentos e superfícies (Saraiva & Baptista 2003). A higienização das mãos deve iniciar-se antes do abastecimento e sempre que se justifique, devendo ser efetuada de acordo com o método exemplificado na ficha técnica (Anexo v). A CAC estabeleceu o “Código de Práticas Internacionais Recomendadas de Princípios Gerais de Higiene Alimentar”, que apresenta os requisitos básicos de higiene e de comportamento relacionados com a produção de produtos alimentares, já referido anteriormente. O princípio alerta para a importância do estado geral de limpeza do corpo e roupas dos manipuladores. Apesar de ser considerada uma superfície crítica, a sua inclusão na *check list* dos pontos de controlo das inspeções, apenas foi efetuada muito depois da realização do presente trabalho experimental.

### III MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. ENQUADRAMENTO

Entre os meses de Dezembro a Março de 2020, procedeu-se à inspeção e recolha de amostras de superfícies, produtos e água do bidão (quando presente), de 19 máquinas dispensadoras de bebidas quentes de uma empresa de *vending* (Anexo I) e posterior análise microbiológica através de diferentes métodos laboratoriais, incluindo a caracterização dos isolados ao nível da capacidade de formação de biofilme, resistência antibiótica e capacidade hemolítica. A escolha das máquinas baseou-se numa amostragem estratificada para a variável “com” ou “sem” bidão. Antes da recolha, foi efetuada a inspeção das máquinas e a medição da temperatura e humidade do interior, durante 24h, e no caso de duas das máquinas, medições destes parâmetros durante três meses, com o intuito de verificar se as condições ambientais poderiam interferir nas características organoléticas do leite em pó.

#### 2. INSPEÇÃO E REGISTO DE TEMPERATURAS E HUMIDADES

A inspeção consistiu na verificação de 21 pontos de controlo, como exemplificado na Tabela 1, em cada uma das máquinas amostradas. Os pontos compreendem equipamentos críticos, aspetos de limpeza e aspetos técnicos e de funcionamento definidos com base nas regras de abastecimento.

**Tabela 1 – Lista de pontos de controlo definidos para máquinas automáticas dispensadoras de bebidas quentes.**

Pontos de controlo	Descrição	Crítérios avaliados
1	Limpeza externa	(acumulação de pó, sujidades...)
2	Limpeza interna	(restos de borras e outros solúveis, salpicos...)
3	Gestão de trocos	(Falta de moedas, erro de contagem...)
4	Preços visíveis	(Falta de etiquetas de preço, led fundido...)
5	Etiquetas identificação	(Falta contacto reclamações e avarias, dados...)
6	Estado exterior máquina	(evidências de desgaste ou mau uso...)
7	Grelha caída do produto	(partida ou suja...)
8	Balde/Tabuleiro resíduos	(sujos, baldes cheios, tabuleiros sujos e entupidos)
9	Bico do açúcar	(sujo, danificado, com crosta, não sobe...)
10	Aspirações	(com resíduos, entupidos, sem concha de proteção, danificados...)
11	Caneco da borra	(entupido, sujo, danificado...)
12	Base da máquina	(com água, suja...)
13	Base dos depósitos	(com restos de solúveis)
14	Vestígios resíduos externos	(“saídas”, lixo em local próprio...)
15	Bicos saída de solúveis	Soltos, sujos, partidos...)
16	Torre/Base de copos	(avaria, suja, sem tampa...)
17	Qualidade dos solúveis	(aspeto visual, cor, textura, cheiro e sabor...)
18	Rutura produtos	(Falta de consumíveis)
19	Bidão	(sem água, furado, sujo por fora, sem tampa de proteção...)
20	Grupo de café	(sujo, avaria...)
21	Rampa colheres	(danificada, suja)

Uma vez registada a “não conformidade”, é obrigatório anexar foto como meio de “prova” e a descrição do respetivo seguimento com vista à resolução. Os pontos de controlo apresentam o mesmo valor de percentagem (4,76%) e podem ser classificados como conforme, “não conforme”, “não conforme-resulta de verificação” e “não verificável”. Ao proceder-se à inspeção do equipamento, pode aceder-se a vários dados importantes tais como: quando foi a última visita do abastecedor e a data da próxima, o historial de inspeções, data da instalação, média diária e semestral de consumos e rota a que está designada. No momento da inspeção, foi colocado um medidor de temperatura e humidade (Easy Log Datalogger USB-LCD Corintech Lascar), ao nível dos bicos de saída dos depósitos dos solúveis e registada a sua temperatura ao fim de 24h (todas as máquinas amostradas- anexo I) e ao fim de 21 dias (máquinas 2 e 15- anexo VI). A leitura foi efetuada de hora em hora nas duas situações.

### 3. PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS E METODOLOGIAS

Os parâmetros microbiológicos analisados de acordo com o tipo de amostra estão exemplificados na Tabela 2.

Tabela 2- Microrganismos analisados e respetivos equipamentos/produtos.

Parâmetros	Tubo dispensador	Leite em pó	Dispensador de copo	Água
<b>Bolores e leveduras</b>	√	√		
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	√	√		
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>	√			√
<b><i>Staphylococcus spp.</i></b>	√	√	√	
<b><i>Escherichia coli</i></b>	√	√	√	√
<b><i>Pseudomonas spp.</i></b>	√			

As práticas laboratoriais utilizadas para este estudo tiveram por base a ISO 7218:2007 (International Organization for Standardization (ISO) 7218, 2007) “*Microbiology of food and animals feeding stuffs- General requirements and guidance for microbiological examinations*”. Os métodos descritos para a análise microbiológica podem ser divididos em quatro fases: processo de recolha e receção, preparação, análise das amostras e confirmação de colónias. Os métodos foram aplicados a zaragatoas de superfícies e amostras de produtos.

#### 3.1. Processo de recolha e receção

Para que as colheitas possam ser realizadas dentro dos parâmetros estipulados o processo de recolha de amostras regeu-se pela norma NP 1828:1982 “Colheita de amostras para análise microbiológica”.

Para a colheita de amostras das superfícies de contato com os produtos, nomeadamente o tudo dispensador e o dispensador de copo, utilizamos uma zaragatoa estéril humedecida em ringer (Oxoid, Inglaterra) e aplicámo-la numa área de 10 cm<sup>2</sup>. A zaragatoa foi friccionada nesta área três vezes, com movimentos giratórios e formando um ângulo de 45° com a superfície, descrevendo movimentos da direita para a esquerda e depois de baixo para cima. A recolha do leite foi efetuada diretamente do bico de saída, o mais cuidadosamente possível para evitar contaminações e utilizou-se um frasco estéril para o seu armazenamento. Para a recolha da amostra de água, utilizamos frascos esterilizados de 200 ml e tentando assegurar todas as condições de assepsia, vertemos essa quantidade do bidão diretamente para o interior do frasco. As amostras foram imediatamente colocadas a temperaturas de refrigeração e transportadas diretamente para o laboratório de tecnologia da Faculdade de Medicina Veterinária, para serem analisadas no mais curto espaço de tempo possível.

### **3.2. Preparação e análise microbiológica**

Começou-se por preparar a suspensão-mãe através da adição de 100 ml de solução ringer (Oxoid, Inglaterra) às amostras de superfície (zaragatoas) e 90 ml à amostra de leite (10 g) em sacos *stomacher* (Bag lenderbag). De seguida, introduzimos as amostras no *stomacker* (homogeneizador mecânico Lab-Blender STO 80) durante 1 min na frequência média e após homogeneização, deixámos repousar durante 30 min. Como não havia informação suficiente acerca do número de diluições esperadas para este tipo de estudo, começamos por inocular diretamente desta primeira suspensão. Caso se verificasse que o crescimento ultrapassava o limite estabelecido, seguiram-se as diretrizes descritas na NP 3005:1985 “Preparação das diluições para análise microbiológica”.

Utilizando a técnica de espalhamento a superfície, semearam-se alíquotas de 0,1 ml em placas de Petri de 9,1 cm de diâmetro (Frilabo, Portugal), contendo o meio seletivo para cada microrganismo (Tabela 3), previamente solidificado. Espalhou-se uniformemente com auxílio de um espalhador estéril (Deltalab, Espanha) até secar e após isso, as placas invertidas (exceto para os bolores e leveduras), foram colocadas a incubar na estufa durante o tempo e temperatura previstos para cada microrganismo. Após o período de incubação, procedeu-se à contagem de colónias características, conforme respetiva ficha técnica (Tabela 3). As amostras de zaragatoas tiveram o mesmo procedimento.

Para as amostras de água, homogeneizaram-se as amostras e filtrou-se o volume de amostra adequado (100 ml), com passagem da água através da membrana filtrante (Normax, Portugal). Com auxílio de uma pinça estéril, retirou-se a membrana e colocou-se na placa com o meio seletivo (Tabela 3), pressionando delicadamente. As placas foram colocadas invertidas na estufa pelo tempo e temperatura previstos para os microrganismos em questão. Após o

período de incubação, procedeu-se à contagem de colónias características, conforme respetiva ficha técnica (Tabela 3).

**Tabela 3 - Meios de cultura, detalhes de inoculação, características das colónias e normas ISO utilizadas para efeitos de enumeração.**

Microrganismos em análise	Meio de cultura	Condições de incubação	Inóculo	Caraterísticas das colónias	ISSO
<b>Bolores e leveduras</b>	Cooke Rose	25 °C ±	0,1 ml superficial	Leveduras-rosa	(3277:2, 1987)
	Bengal	1 °C/ 120h ± 4h		Bolores-várias tonalidades (Oxoid, 2021b)	
<b>Bacillus cereus</b>	Bacillus cereus	35 °C ±	0,1 ml superficial	Azuis com halo	(21871 2006)
	Selective Agar	1 °C/ 18 a 24h ± 4h		(Scharlau 2017)	
<b>Enterococcus spp.</b>	Slanetz and Bartley Agar	36 °C±	0,1 ml superficial	Cor vermelho-escuro a claro	(7899:2 2000)
		2 °C/ 44±4 horas	Membrana filtrante	(Scharlau 2013)	(7899:2 2000)
<b>Staphylococcus spp.</b>	Manitol Salt Agar	37 °C± 1 °C/ 48h ± 4h	0,1 ml superficial	Amarelas com halo (Scharlau, 2020)	(6888:1 1999) c/alterações
<b>Escherichia coli</b>	Tryptone Bile X-Glucurodine (TBX)	44 °C ±	0,1 ml superficial	Azul/ azul-esverdeado	(16649:2 2001)
		1 °C/ 18h a 24h ± 4h	Membrana filtrante	(Scharlau, 2013a)	
<b>Pseudomonas spp.</b>	Pseudomonas Agar	25 °C± 1 °C/ 44h ± 4h	0,1 ml superficial	Cor creme c/ fluorescência verde / castanha (Oxoid, 2021a)	(13720 2010) c/ alterações

Para efeito comparativo, procedemos à inclusão de controlos (estirpes de referência da coleção internacional ATCC – *American Type Culture Collection*), utilizando matrizes contaminadas artificialmente, de forma a potenciar o crescimento dos microrganismos alvo, quando inoculadas em meios de cultura específicos para o crescimento dos mesmos. As linhagens utilizadas foram *Bacillus cereus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

#### 4. CONTAGEM E CARATERIZAÇÃO FENOTÍPICA

As colónias características foram contadas e expressas em UFC por cm<sup>2</sup> de superfície, por ml e por grama de acordo com a norma 7218:2007 “Microbiology of food and animals feeding stuffs General requirements and guidance for microbiological examination”.

$$\text{Resultado} = \frac{\sum x}{V(n_1 + 0,1n_2) d} \text{ UFC/g ou ml (adaptado de Guerra 2016)}$$

Em que:

$x$  - número de colónias em todas as placas selecionadas;  $n_1$  – número de placas selecionadas na primeira diluição;  $n_2$  – número de placas selecionadas na segunda diluição;  $V$  – Volume de inóculo em cada placa, em mililitros;  $d$  - Nível de diluição correspondente à primeira diluição selecionada (a suspensão inicial é uma diluição).

Em relação às zaragatoas conforme a norma 18593:2004 “*Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*”, para se realizar a contagem das colónias típicas por cm<sup>2</sup> de superfície a analisar (UFC/cm<sup>2</sup>) utiliza-se a seguinte equação:

$$\text{UFC/cm}^2 = \frac{N \times F}{A}$$

No qual,  $N$  corresponde ao número de UFC/ml da suspensão,  $F$ , fator de diluição da amostra em ml e  $A$ , a área a ser avaliada em cm<sup>2</sup>.

Todas as colónias foram submetidas ao método de coloração de Gram e comparadas com as estirpes de referência da coleção internacional ATCC.

#### 5. CARATERIZAÇÃO GENOTÍPICA - PCR (RAPD)

A técnica PCR (RAPD) (*randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting*), baseia-se na amplificação por PCR de sequências de DNA localizadas em zonas repetidas, específicas e intercaladas em genomas procarióticos (Gevers et al. 2001).

A técnica consistiu em selecionar colónias representativas, provenientes de equipamentos e superfícies críticos, e avaliar através do método RAPD-PCR se seriam geneticamente semelhantes entre elas. Selecionaram-se cinco colónias representativas de cada meio, que foram posteriormente repicadas em meio de crescimento não seletivo, *Brain Heart Infusion Agar* (BHI), (Conda, Espanha) e colocadas em estufa a 36 °C ±1 °C durante 24h para obtenção de colónias viáveis.

### 5.1. Extração de DNA

Para a rápida extração de DNA genómico recorreu-se ao método de *boiling*. Uma pequena porção de cultura foi suspensa em 50 µl de TE (Tris-EDTA *buffer* com 0,1% (v/v) com 0,1% *Tween* 20 (Merck, Estados Unidos). De seguida aqueceu-se a mistura na placa térmica (*Digital Heater* - VWR USA), a 100 °C e a seguir, colocou-se em gelo durante 10 min. O elevado aquecimento e a diferença de temperatura, têm como objetivo fazer com que as células “rebentem” de modo a expor o DNA. No final, as suspensões bacterianas foram centrifugadas (13000 rpm, 4 °C, 5 min) e guardadas a -20 °C até utilização.

### 5.2. Amplificação por PCR

A mistura de reação foi preparada adicionando 10 µl de *Master Mix* NZYTaQ II 2x incolor (NZYTech, Portugal) contendo: 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, Buffer 10x, NZYTaQ II DNA polimerase (MB354) 0,2 U/µl e desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), a 1 µl de *primer* M13 a 50 pmol (5' - GAG GGT GGC GGT TCT - 3') e 7 µl de água miliQ. Depois da mistura reacional estar preparada, adicionaram-se 2 µl do respetivo DNA a cada tubo.

As amplificações foram feitas num termociclador *Doppio* (VWR, USA), seguindo um protocolo que inclui uma desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, seguindo-se 40 ciclos, começando pela desnaturação a 94 °C, durante 60 s, passando para o *annealing* a 40 °C durante 2 min em que o *primer* estabelece ligação às suas sequências complementares no DNA molde de cadeia simples, emparelhando dois ou três nucleótidos de forma específica e depois hibridiza e por fim termina os ciclos com a extensão a 72 °C durante 2 min e com passo final de extensão a 72 °C durante 10 min. No fim os produtos de amplificação foram armazenados a 4 °C até à realização da eletroforese.

### 5.3. Eletroforese

De modo a observar o DNA amplificado foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) (Lonza, USA) em tampão Tris-Borate-EDTA 0,5X (TBE 10X: 0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico e 0,02 M EDTA) (Frlabo, Portugal). Foram usados 8 µl de cada produto de PCR, aos quais se adicionaram 2 µl de GelStar (solução stock 10x) (Lonza, USA) e 2 µl de azul de bromofenol (Nzytech) Foi adicionado o marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen-ThermoFisher, Inglaterra) em dois locais opostos do gel de agarose. A separação dos produtos foi realizada em tampão TBE 0,5X, 110V durante 1h e 30 min. A visualização, foi efetuada com luz ultra-violeta (UV), através do equipamento *ChemiDocXRS* e do programa *ImageLab*.

Através da comparação do perfil de bandas, selecionaram-se 11 representantes, cinco dos quais pertencentes ao género *Pseudomonas* spp., três do género *Enterococcus* spp. e três do género *Staphylococcus* spp. para os ensaios subsequentes.

## 6. POTENCIAL PATOGENICO

### 6.1. Avaliação da capacidade de produção de biofilme

O método de coloração pelo cristal violeta, utilizando microplacas de poliestireno (VWR, China), é utilizado frequentemente para avaliar a capacidade de produção de biofilme, corando a biomassa total, incluindo células vivas e mortas, não fornecendo informação acerca do número de células viáveis (Bocelli 2016). O método e interpretação de resultados utilizados, tiveram por base o protocolo descrito por Stepanovic, (Stepanović et al. 2007).

Os ensaios realizaram-se testando em simultâneo os 11 isolados selecionados a partir do PCR, e a estirpe ATCC15442, *Pseudomonas aeruginosa*, forte produtora de biofilme, que foi usada como controlo positivo. Para a suspensão bacteriana inicial, preparou-se em cuvetes, diluições de 1:10 de cada cultura e mediu-se a densidade ótica (DO) a um comprimento de onda de 620 nm num espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000). Sabendo que uma unidade de absorvância corresponde a  $1,5 \cdot 10^8$  UFCml<sup>-1</sup>, conseguimos determinar o volume necessário a retirar para obter essa mesma quantidade em cada suspensão bacteriana. Recolheu-se o volume necessário para microtubos e centrifugou-se durante 3 min (Eppendorf, Cenytrifuge 5415R) (Stepanović et al. 2007).

Numa microplaca de 96 poços (VWR, China), foram colocados em cada poço, 150 µl de meio BHI líquido (Scharlau, Espanha), e adicionados 3 µl de suspensão bacteriana. Nove poços, foram incubados sem a inoculação de cultura bacteriana, de modo a obter o controlo de esterilidade do processo (controlo negativo). A placa foi incubada a 25 °C, por forma a mimetizar a temperatura interna das máquinas dispensadoras e repetiu-se o procedimento de forma a obter incubações de 24, 48 e 72h. No final destes períodos, o conteúdo foi descartado e de seguida a placa foi submersa em ringer três vezes, com os poços voltados para cima, e colocada a secar na hotte na velocidade 1. Depois de seca, adicionou-se 100 µl de Cristal Violeta (CV) a 0,2%, a cada poço, durante 15 min. Posteriormente enxaguou-se três a quatro vezes em água destilada e novamente colocada a secar na hotte. Após o procedimento estar concluído, adicionou-se 125 µl de álcool:acetona (80:20), por poço, durante 15 min. Por fim foi medida a absorvância da placa a 580 nm com agitação normal durante 30 s no leitor de microplacas *Sunrise* (Tecan, Suíça). Foram realizados três ensaios independentes e em triplicado.

Os valores finais da absorvância das estirpes testadas foram expressos como o valor médio da absorvância ou DO das estirpes, subtraindo o valor da média do controlo negativo (DO<sub>cn</sub>), calculado para cada ensaio separadamente. Para valores onde se obtiveram valores negativos, atribuiu-se o valor zero. Com base nos valores de densidade ótica calculados anteriormente, se  $DO \leq DO_{cn}$ , não é produtor de biofilme,  $DO_{cn} < DO \leq 2DO_{cn}$ , é fraco produtor de biofilme,  $2DO_{cn} < DO \leq 4DO_{cn}$ , médio produtor de biofilme e forte produtor de biofilme se  $DO > 4DO_{cn}$  (Stepanović et al. 2007).



## 6.2. Análise de dados

Os dados obtidos foram analisados usando o Microsoft Excel 365, recorrendo às ferramentas de estatística e de desenho de gráficos. Foi realizado um teste estatístico pelo método ANOVA medidas repetidas, no programa SPSS versão 26, para analisar diferenças entre as amostras quando comparadas com o controlo negativo. A análise estatística permitiu-nos efetuar comparações estatísticas entre a capacidade de formação de biofilme dos isolados e o controlo negativo nos três períodos de incubação e obter resultados com nível de significância de 95%. O valor p, determina se a diferença entre eles, é significativa. Se p for < 0,05, as diferenças são estatisticamente significativas, se pelo contrário, o valor de p for >0,05, não há diferença significativa.

## 6.3. Resistência a antibióticos

Esta etapa consistiu em testar a resistência a 13 antibióticos, de nove classes diferentes, de acordo com a disponibilidade de stock em laboratório e importância clínica, conforme Tabela 4. A sua execução e classificação foi efetuada segundo os critérios *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2019 (Matuschek et al 2014), cujos limites de sensibilidade estão descritos no Anexo VIII.

**Tabela 4- Antibióticos, classes, alvos e concentrações utilizadas.**

Antibióticos	Concentração (mg)			Classe	Alvo/ Inibição
	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.		
<b>Estreptomicina</b>	300	-	-	Aminoglicosídeos	síntese proteica
<b>Gentamicina</b>	-	10	10		
<b>Gentamicina</b>	120	-	-	β-lactâmicos	síntese da parede celular
<b>Aztreonam</b>	-	-	30		
<b>Ceftazidima</b>	-	-	30		
<b>Imipenem</b>	-	-	10		
<b>Cloranfenicol</b>	30	-	-	Cloranfenicol	síntese proteica
<b>Quinupristina Dalfopristina</b>	15	-	-	Estreptograminas	
<b>Vancomicina</b>	30	-	-	Glicopéptido	síntese da parede celular
<b>Clindamicina</b>	-	2	-	Lincosamidas	síntese proteica
<b>Ciprofloxacina</b>	-	5	-	Quinolonas	síntese de DNA
<b>Rifampicina</b>	-	5	-	Rifampicina	síntese proteica
<b>Trimetoprima - Sulfametoxazol</b>	-	25	-	Trimetoprima - Sulfametoxazol	

O método corrente utilizado para avaliar o padrão de resposta foi o método de difusão em agar (método de *Kirby-Bauer*). Baseia-se na inibição do crescimento de um microrganismo, inoculado na superfície de um meio de cultura, onde se colocam discos de papel de filtro, impregnados com um antibiótico de concentração padronizada. A leitura é feita 16 a 20 horas após a incubação, avaliando-se o diâmetro do halo de inibição ao redor do disco. Os halos de inibição são medidos em mm e a medição é efetuada no fundo da placa. Os resultados são comparados com os de uma tabela, onde estão relacionados os tamanhos dos halos indicando sensibilidade (S), sensibilidade intermédia (I) ou resistência (R) aos antibióticos. A análise para multiresistência foi realizada de acordo com a definição proposta por Magiorakos et al. (2012).

Preparou-se o agar *Müller Hinton* (Scharlau, Espanha), de acordo com as instruções do fabricante. No dia seguinte, suspendemos as colónias recentemente inoculadas, para um tubo com ringer (Oxoid, Inglaterra), e através do padrão de turbidez 0,5 da escala de *McFarland* (aproximadamente  $10^8$  CFU/ml) procedeu-se à sua suspensão. Posteriormente, inoculou-se 0,1 ml da suspensão no meio, e com auxílio de um espalhador estéril (Deltalab, Espanha), distribuímos uniformemente o inóculo. Colocou-se de imediato a seleção de antibióticos, nunca excedendo o número de cinco discos (Oxoid, Inglaterra e Frilabo, Portugal) em cada placa, e com um distanciamento razoável entre cada um. Depois de bem aderidos e sem ultrapassar os 15 min após a sua colocação, incubou-se durante 24h a 35 °C. Depois da incubação, os diâmetros dos halos foram medidos e interpretados de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2019) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST 2019). Apesar do EUCAST ser mais adaptado à realidade portuguesa, não existem valores para todos os antibióticos estudados, por isso recorreu-se também à CLSI. Para além disso, trata-se de uma organização mais recente. Desta forma conseguimos complementar a interpretação dos resultados.

#### **6.4. Actividade hemolítica**

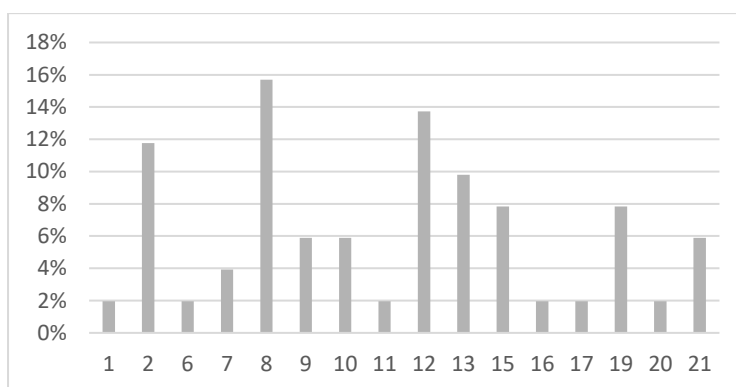
Outra prova de interesse no presente estudo foi a análise da atividade hemolítica. Repicaram-se colónias de cada isolado, para placas de petri com meio Columbia Agar com sangue de cavalo a 5% (Frilabo, Portugal). Posteriormente, as placas, foram a incubar durante 48h a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . A atividade hemolítica foi avaliada através da cor do agar ao redor e por baixo das colónias, após o período de incubação. Coloração verde por baixo das colónias, considera-se  $\alpha$ -hemolíticas, pela redução da hemoglobina a metemoglobina com hemólise parcial, no caso de a coloração ser branca e o agar não apresentar mudanças na cor ou opacidade, as bactérias foram consideradas  $\gamma$ -hemolíticas, ou não hemolíticas, e se o agar apresentasse zonas transparentes ao redor das bactérias, foram consideradas  $\beta$ -hemolíticas pela ocorrência de hemólise total (Liofilchem S.r.l 2018)

## IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram amostradas superfícies, leite em pó e água do bidão, quando presente, de 19 máquinas dispensadoras de bebidas quentes. Aquando da recolha, efetuou-se a inspeção e o registo da temperatura e humidade relativa durante 24 h.

### 1. RESULTADOS QUALITATIVOS

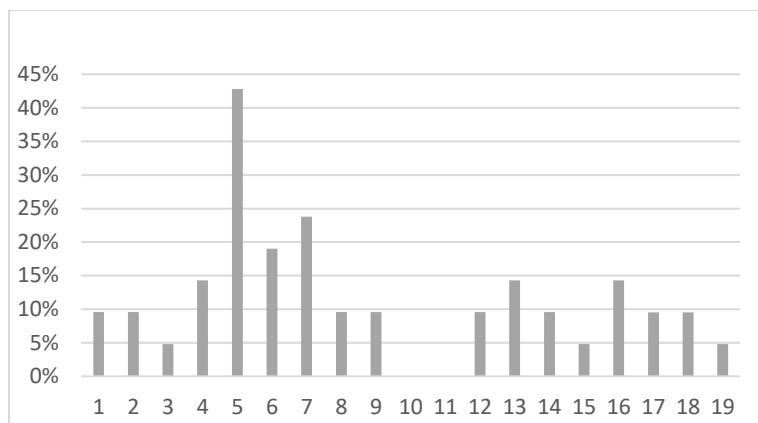
No resultado do cálculo das frequências dos pontos de controlo, a Figura 3 mostra que das 19 máquinas inspecionadas, os pontos 8 (balde e tabuleiro de resíduos), 12 (base da máquina) e 2 (limpeza interna), foram os mais referenciados com uma percentagem de 15,7%, 13,7% e 11,8% respetivamente.



**Figura 3 - Percentagens de cada “não conformidade” em cada ponto de controlo nas 19 supervisões efetuadas ao longo do estudo.** Legenda: 1-limpeza interna;2-limpeza externa; 6-Estado exterior máquina; 7-Grelha caída do produto;8-Balde/Tabuleiro resíduos; 9-Bico do açúcar; 10 -Aspirações; 11 - Caneco da borra; 12-Base da máquina; 13-Base dos sepósitos;15-Bicos saída dos solúveis; 16-Torre/Base de copos; 17-Qualidade dos solúveis;19-Bidão; 20-Grupo café; 21-Rampa colheres

Destes três, o mais relevante para o presente estudo deveria ser a limpeza interna, mas trata-se de um ponto algo subjetivo uma vez que se pode traduzir em paredes salpicadas, restos de borras de café espalhadas, e outros aspetos inerentes ao funcionamento dos equipamentos. Apesar de serem importantes para a monitorização da limpeza dos equipamentos e refletirem o maior ou menor cuidado do abastecedor, podem não representar um risco direto para a segurança do produto. Mais impacto terá a acumulação de resíduos no tabuleiro, que pelas condições húmidas, levará à multiplicação de fungos e pode-se tornar um chamariz para o aparecimento de pragas. Os resultados obtidos correspondem em parte ao que se tem vindo a verificar nas supervisões (dados não mostrados), exceto para o ponto das aspirações cuja percentagem é mais elevada.

Outra questão prende-se não com o que estava “não conforme”, mas em que percentagem, e no geral, 84,2% das “não conformidades” foram menores ou iguais a 14,3% (Figura 4), o que se traduz por apenas três pontos “não conformes”.



**Figura 4 - Percentagens de “não conformidades” por máquina amostrada.**

Mais de 50% das amostras obtiveram resultados abaixo dos quatro pontos de controlo “não conforme” no universo de 21 pontos verificados. São dados que podem ser considerados positivos, mas tudo depende do tipo de “não conformidade”. Se tivermos cinco pontos “não conforme”, como por exemplo, aspirações, dispensador, solúveis, bidão e tabuleiro, estes vão ter maior impacto na segurança das bebidas. Por outro lado, se tivermos cinco pontos relativos ao aspeto exterior da máquina, etiquetas de identificação, trocos, base da máquina e balde de resíduos, teremos a mesma percentagem de “não conformidades”, contudo o risco para a segurança do produto final será maior no primeiro resultado do que no segundo, que apenas referenciou aspetos técnicos e relacionados ao funcionamento.

Relativamente ao valor médio de temperatura e humidade relativa (HR) registados nas 19 máquinas amostradas, este foi de 25 °C e de 53,67% respetivamente (Anexo I). Todos os microrganismos possuem uma gama de temperatura de crescimento ótima e a maioria dos microrganismos patogénicos encontra condições ótimas de crescimento entre os 30 e os 45 °C. No caso do nosso estudo, a gama de temperaturas no interior das máquinas, ao longo de 24 h, situou-se entre os 20 e os 30 °C, o que representa uma gama ótima para o crescimento de microrganismos psicotróficos, e relativamente à HR, o valor médio obtido apresentou-se abaixo dos 60%, à exceção das máquinas 10 e 15. A média de valores dos parâmetros ao longo dos três meses, das máquinas 15 e 2 (Anexo IV), foi ao encontro do observado nas 24h de medição, não querendo isto dizer que serão todos iguais, pois a medição nas 24h pode não refletir o verdadeiro valor.

## **2.RESULTADOS QUANTITATIVOS**

Os resultados microbiológicos obtidos no presente trabalho estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados microbiológicos.

Origem	Tubo dispensador UFC/cm <sup>2</sup>							Leite em pó UFC/g					Dispensador copos UFC/cm <sup>2</sup>		Água UFC/100ml	
	<i>B.cereus</i>	Bolores	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	Estafilococos Coagulase +	Leveduras	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>B.cereus</i>	Bolores	<i>E.coli</i>	Estafilococos coagulase +	Leveduras	Estafilococos Coagulase +	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>E.coli</i>
1	-	-	-	-	-	<1,5*10 <sup>2</sup>	-	-	<1,5*10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	<1,5*10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	>9,0*10 <sup>3</sup>	-	-	-	>1,4*10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	<1,5*10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	<1,5*10 <sup>2</sup>	<1,5*10 <sup>2</sup>	-	<1,5*10 <sup>3</sup>	-	-	-	<1,5*10 <sup>2</sup>	-	-	-
5	-	-	-	-	-	<1,5*10 <sup>2</sup>	>1,5*10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	1,6*10 <sup>2</sup>	<1,5*10 <sup>2</sup>	-	<1,5*10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
7	-	3,8*10 <sup>2</sup>	-	<1,5*10 <sup>2</sup>	-	8,1*10 <sup>2</sup>	>2,9*10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	4,0*10 <sup>2</sup>	-	<1,5*10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	1,01*10 <sup>3</sup>	-	<1,5*10 <sup>3</sup>	-	-	-	9,0*10 <sup>2</sup>	-	-	-
10	-	-	-	>2,15*10 <sup>3</sup>	-	-	<1,5*10 <sup>2</sup>	-	>8,0*10 <sup>3</sup>	-	-	8,9*10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
11	-	6,9*10 <sup>2</sup>	-	-	-	5,5*10 <sup>2</sup>	-	-	1,6*10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	1,9*10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	<1,5*10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	1,9*10 <sup>2</sup>	-	-	-	1,04*10 <sup>3</sup>	-	-	<1,5*10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	>7,15*10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	>1,1*10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-
16	-	<1,5*10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	>1,4*10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	<1,5*10 <sup>2</sup>	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1*10 <sup>2</sup>	-	-
18	-	-	-	-	-	1,05*10 <sup>3</sup>	-	-	<1,5*10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<1,5*10 <sup>3</sup>	7,4*10 <sup>3</sup>	-	-	-	-

Legenda: O símbolo " - "significa que não foram visualizadas colônias, devendo ser considerado o valor estimado para contagens abaixo do limite mínimo " , ou seja, <1,5\*10<sup>2</sup> ou <1,5\*10<sup>3</sup> no caso do leite. Para placas com multiplicação de colônias, utilizamos estes valores e >1,5\*10<sup>3</sup> quando acima do limite máximo.



De acordo com os dados obtidos no presente estudo, os bolores e leveduras foram os microrganismos predominantes, presentes em 32,2% nas amostras analisadas, seguidos das pseudomonas (20%), enterococos (12%) e estafilococos (4%).

Os bolores foram encontrados na maioria, nas amostras de leite em pó, enquanto as leveduras o foram, no tubo dispensador. Pela análise macroscópica das placas, os bolores apresentavam-se com aspeto filamentososo, circular e com tamanhos que variavam entre os 2 mm e 4 cm de diâmetro. A parte externa apresentava-se na maior parte das vezes com cor branca e a zona central, verde com tonalidade rosa no inverso. Como visto anteriormente, para além do pressuposto de que os bolores são microrganismos pouco exigentes e que crescem em praticamente todo o lado (Saraiva et al. 2019), os seus esporos podem ser transmitidos facilmente por via aérea, aquática ou através de vetores como os insetos. Se houver desenvolvimento de bolores em qualquer equipamento devido à falta de limpeza e acumulação de resíduos, como exemplifica a Figura 5, a probabilidade de se poder transmitir a outros equipamentos adjacentes e aos produtos, é elevada.



**Figura 5 - Tabuleiro de máquina dispensadora de bebidas quentes, modelo Bianchi com presença de bolores (máquina não incluída no estudo).**

A amostra de leite da máquina 15, apresentou a maior contagem de bolores ( $>1,1 \cdot 10^4$  UFC/g). O leite apresentava-se com cor amarelada, grumos e cheiro azedo, denotando alteração do produto, por isso na inspeção, o ponto referente à qualidade dos solúveis, foi classificado como “não conforme”. A leitura da HR e temperatura efetuadas durante três meses, registou uma média de valores da HR de 61,91% em Agosto, 58,87% em Setembro e de 61,28% em Outubro (Anexo IV), com valores que ultrapassavam os 65%. Segundo a literatura, a aw do leite em pó não permite o crescimento microbiano (Augustin et al. 2003), mas se o leite estiver em contacto permanente com níveis elevados de humidade do ar e vapores quentes provenientes do “grupo” de café, pode começar a absorver humidade e alterar as suas características intrínsecas, resultando em alterações químicas, físicas e /ou crescimento de bactérias e fungos (Al - Atrash 2019).

A máquina 10, cujo consumo é bastante superior às das máquinas acima referidas, apesar de não apresentar alterações organolépticas do leite em pó no momento da inspeção,

apresentou, à semelhança da máquina 15, contagens elevadas de bolores ( $>8,0 \cdot 10^3$ ). Neste caso, não podendo aferir sobre a influência da HR, dado a sua leitura ter sido efetuada apenas em 24 h, a explicação para a elevada contagem de bolores, é de difícil interpretação. Na inspeção, a máquina obteve zero “não conformidades” o que traduz boas condições de higiene e para além disso, a rotatividade do produto é elevada. Talvez o funcionamento elevado do “grupo” de café, que se encontra próximo ao bico de saída do leite, exale vapor de água, fazendo com que ocorra absorção de humidade e desta forma, crie condições mais favoráveis ao desenvolvimento de bolores.

Em relação às leveduras, quando crescidas *in vitro*, apresentaram colónias circulares de cor rosa e aspeto céreo brilhante, conforme as especificações do meio Cooke Rosa Bengal da marca Oxoid, ThermoFisher. As suas dimensões variaram consideravelmente, com limites desde 1 a 5 mm de diâmetro. A maior parte das leveduras foi encontrada no tubo dispensador e estes resultados podem estar relacionados com a disponibilidade do oxigénio e teor de humidade pois as leveduras sendo aneróbias facultativas (Jay et al. 2008), e mais adaptadas a ambientes húmidos, as condições de humidade no interior do tubo, são sempre mais elevadas e a disponibilidade de oxigénio é menor.

Segundo os valores guia do INSA de 2019, para a presença de bolores e leveduras em alimentos do Sub-grupo 1A, (Anexo IV), os valores encontrados no leite em pó, seriam na sua maioria questionáveis se estivessem presentes nas bebidas e no caso da máquina 15, insatisfatório. Depreendemos que a temperatura da água possa ter eficácia na diminuição da carga microbiana para valores aceitáveis ou até na inativação total dos microrganismos, mas as análises anuais efetuadas pela empresa, já apresentaram outrora, valores acima do recomendado para microrganismos totais a 30 °C, o que leva a crer que, para além de haver falhas nos procedimentos de limpeza, o binómio temperatura/tempo, não é suficiente para diminuir a carga microbiana a níveis aceitáveis.

A verdadeira preocupação dos resultados acima apresentados, prende-se com a possibilidade dos fungos produzirem esporos resistentes ao tratamento térmico da água do misturador, que, para além de poderem ser inalados para os pulmões, podem conter quantidades significativas de micotoxinas (USDA 2013).

Relativamente à pesquisa de *Bacillus cereus*, numa fase inicial do estudo, observou-se crescimento acentuado de colónias provenientes do leite em pó e do tubo dispensador, mas estas não apresentavam as características esperadas, ou seja, as colónias típicas deveriam ter cerca de 5 mm de diâmetro e apresentar cor azul-turquesa rodeadas por halo opaco no meio de cultura *Bacillus cereus selective Agar* (Holbrook & Anderson, 1980; Scharlau, 2017), e apresentaram-se em quatro cores distintas; azuis, brancas, amarelas escuras e verdes, sem halo, e a maioria com 2 mm de diâmetro. Para confirmar esta questão, à semelhança do que fizemos para os restantes microrganismos detetados, repicamos as



colónias morfológicamente distintas e procedemos à coloração pelo método de Gram, comparando-as com a estirpe tipo desta espécie (ATCC25923). Os resultados estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6 - Caracterização das colónias isoladas do meio *Bacillus cereus* Selective Agar (BCSA) na amostra 5 e comparação com a estirpe tipo (ATCC25923).**

Código	Caraterização macroscópica					Caraterização microscópica		
	Cor	Tamanho (mm)	Halo	Margem	Elevação	Nº Colónias	Forma	Gram
<b>Controlo</b>	Azul	-	Sem	-	-	Sem	Bacilos	<b>+</b>
<b>TCR1-A</b>	Azul	-	Sem	-	-	Sem	Cocos / Cocobacilos	-
<b>TCR1-B</b>	Branca	1	Sem	Regular	Convexo	> 150	Cocos - Sarcina	<b>+</b>
<b>TCR1-AE</b>	Amarela escura	2	Sem	Regular	Convexo	> 150	Cocos - Diplococos	-
<b>TCR1-V</b>	Verde	2	Com	Regular	Convexo	> 150	Cocos - Diplococos	-
<b>TCR2-A</b>	Azul	1,5	Com	Irregular	Convexo	11	Cocos - Diplococos / Cadeias curtas	-

Legenda:As letras A,AE,B,V referem-se à cor da colónia, sendo que A é para azuis, AE para amarelo escuro, B para brancas e V para verdes. O número 1 e 2 são colónias da mesma cor, mas com halo e sem halo. A letra T refere-se ao tubo dispensador e CR ao nome do cliente de onde a máquina teve origem (Cabo Ruivo).

A caraterização da morfologia, pigmentação e coloração diferencial, permitiu verificar que a maior parte dos microrganismos para além de serem Gram negativos não apresentavam a morfologia em bastonete, típica do género. Outros *Bacillus* spp. poderiam ter crescido no meio, contudo apresentariam forma e cor diferente. O que acabou por ser contraditório, foi a multiplicação de bactérias Gram negativas. Uma possível explicação pode estar relacionada com a elevada presença destes microrganismos que de alguma forma, lhes permitiu superar o fator inibitório presente no meio. Estes resultados não vão ao encontro do historial que se tem verificado, visto a maior parte dos estudos efetuados em solúveis como o leite em pó e chocolate em pó, terem identificado este microrganismo (Bovermann 2017; Nelms et al. 1997).

Outro dos microrganismos que se mostrou ausente, foi *Escherichia coli*  $\beta$  glucuronidase positiva. As colónias, quando presentes, deveriam apresentar cores em tons de azul/azul-esverdeado de acordo com a ficha técnica do meio seletivo, TBX (Scharlau, 2013b), devido à presença da enzima  $\beta$ -D-glucuronidase, que rompe a ligação do substrato cromogénico absorvido, e, apesar de 34% das espécies de *E.coli* serem  $\beta$  glucuronidase negativas (Chang et al 1989), não se observaram colónias caraterísticas. Este facto representa um dado positivo para a ausência de contaminação fecal e satisfação de critérios legais, mas a deteção de *E. coli*, da mesma forma que não deve ser encarada como um indicador fiável de que patogénicos fecais estejam presentes no alimento, a sua ausência também não garante a ausência de patogénicos entéricos (Mossel, 1967; Silliker & Gabis, 1976). Para além disso, a *E. coli*, é um microrganismo termo sensível, ou seja, a temperatura

da água facilmente o poderá destruir, os *Enterococcus* spp. por outro lado, são, dos microrganismos não esporulados, os mais termo tolerantes (Franz et al. 2003).

Relativamente à pesquisa de enterococos, ocorreu multiplicação em duas amostras da superfície do tubo dispensador, nas máquinas 10 e 15 e na amostra de água proveniente da máquina 17 e este resultado foi insatisfatório segundo os requisitos legais em vigor (Decreto Lei nº 306/2007 de 5 de Setembro, 2007, alterado pelo Decreto-Lei 152/2017). A sua presença não foi detetada no tubo dispensador da mesma máquina. Apesar dos enterococos poderem ser veiculados pela água, o resultado pode advir de contaminação recente, ou seja, pela manipulação do operador nos fios de alimentação da bomba submersível, ou mais provavelmente, sugerir falhas no processo de higiene dos bidões. A sua presença nas máquinas dispensadoras indica contaminação fecal e falta de higiene no processo. Para além disso, pode ser preocupante no sentido de poder disseminar a resistência a antibióticos clinicamente importantes, como veremos mais à frente nos resultados.

Relativamente às análises à presença de estafilococos, a análise macroscópica permitiu diferenciar entre isolados potencialmente patogénicos (*S. aureus*) e não patogénicos (*S. epidermidis*), embora esta diferenciação seja apenas indicativa. De acordo com as especificações da ficha técnica do meio seletivo (*Manitol Salt Agar*), as colónias que se apresentassem com forma circular, com pelo menos mais de 2 mm de diâmetro, amarelas brilhantes e com presença de halo à volta da colónia, eram características, devido à redução do manitol. Analisaram-se as suas características microscópicas após coloração de Gram e estas estavam de acordo com a estirpe tipo, ATCC25923.

Dos resultados obtidos para estafilococos, a incidência foi baixa (4%), no entanto, dadas as características das colónias poderem sugerir tratar-se de espécies coagulase positivas, a amostra 19, do leite em pó, foi considerada insatisfatória segundo o Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão, de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos. Este resultado pode significar que a matéria-prima apresenta falhas na produção e/ou contaminação pós-processamento, dado haver muita manipulação do bico de saída do leite. Nas superfícies, nomeadamente no dispensador de copos, e segundo os VMA do INSA de 2019 para zona 1, (Anexo IV), as amostras 4, 9 e 16, também se revelaram insatisfatórias, e a presença pode estar relacionada com má higienização das mãos e contaminação cruzada, quer por parte do operador como do utilizador. Não são valores significativos em termos de ocorrência e não havendo certeza de se tratar efetivamente de uma espécie patogénica, mais testes confirmatórios teriam de ser executados. Por outro lado, num grande número de amostras foi detetada a presença de colónias não características, principalmente no tubo dispensador. Estas apresentavam-se redondas, com diâmetro menor que 2 mm e com cor branca, sem alteração da cor vermelha do meio, o que é característico de espécies coagulase negativas,

tais como, *Staphylococcus epidermidis* (Scharlau, 2020). Apesar de não termos confirmado qual a espécie em causa, é importante ter em conta que este microrganismo é um colonizador permanente e omnipresente da pele humana. A frequência das infeções causadas por este microrganismo, e o fato de serem extremamente difíceis de tratar, representam um problema sério para o sistema público de saúde. O tratamento é dificultado pela presença de genes específicos de resistência a antibióticos e pela formação de biofilmes (Otto, 2009; Uckay et al., 2009)

Colónias presuntivas de *Pseudomonas* spp. estiveram presentes em 20% das amostras e a amostra 16, apresentou as maiores contagens ( $> 1,4 \cdot 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>). A caracterização ao nível da morfologia, pigmentação e coloração diferencial, revelou tratar-se de bacilos Gram negativos, com colónias de cor palha, com e sem fluorescência, no entanto, mais testes confirmatórios seriam necessários para confirmar a espécie. (Oxoid, 2020). Apesar da sua ocorrência não ter sido elevada, o resultado indica que ou a água está contaminada, ou há indícios de falta de higiene. Não existe um critério microbiológico definido para pseudomonas nas águas da rede pública, só nas águas minerais naturais e águas de nascente (Decreto Lei nº 156/98 de 6 de Junho, 1998), portanto a sua análise não está incluída no plano de análises anual à água de fornecimento, de qualquer forma, das cinco amostras, três (16,7 e 8), eram provenientes de fonte externa à empresa de *vending* isto porque apesar das máquinas possuírem bidão, o cliente autorizava o enchimento no próprio local.

### 3. SELEÇÃO DE REPRESENTANTES

Foram analisadas 55 colónias no total, provenientes de 10 máquinas, com exceção das colónias de estafilococos provenientes da amostra 19 e 16, que não foram sujeitas ao procedimento, visto a recolha ter sido antes da entrada em vigor do confinamento devido à COVID-19, acabando por ficar contaminadas. As colónias de cada amostra, sujeitas ao método de PCR (RAPD), apresentaram semelhança entre elas, com perfil de bandas idêntico entre os isolados de cada género, exceto os isolados S41, S43 e S50, provenientes do dispensador de copos da máquina 9. O fato de existirem três perfis diferentes sugere que pode tratar-se de colónias geneticamente distintas, possivelmente de espécies diferentes., e que este equipamento apresenta elevada manipulação. Para além disso, o isolado com a designação, S50 (S de *Staphylococcus*), apresentou um perfil de bandas semelhante a S57 da amostra 4. Este facto pode ser explicado pelo operador que abastecia a rota da máquina 9, ter sido transferido para a rota 4, em substituição das férias. A possível troca de utensílios também poderá estar na origem. Depois de concluída a confirmação genotípica de todos os isolados, selecionou-se aleatoriamente um de cada grupo, e obtivemos onze isolados, representando todas as amostras em que se confirmou crescimento microbiano e géneros em estudo, (Tabela 7).

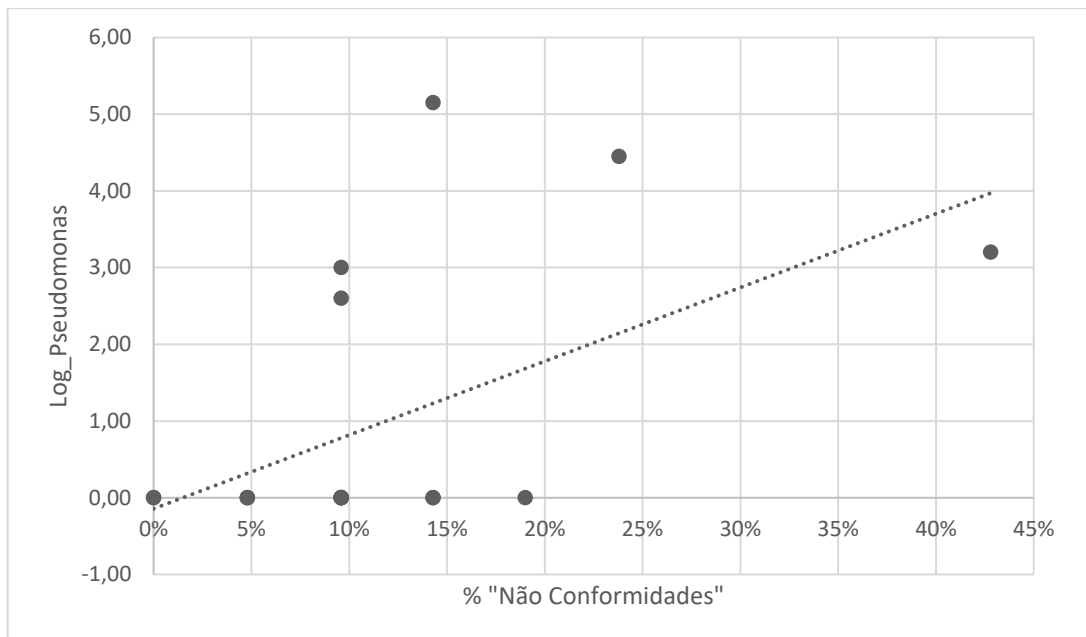
**Tabela 7 - Isolados selecionados e respetiva origem.**

	Código	Equipamento	Máquina	Caraterísticas do local
Gram -	<b>1PT</b>	Tubo dispensador	16	Empresa de elevadores
	<b>2P</b>	Tubo dispensador	7	Empresa de transporte de mercadorias
	<b>3PF</b>	Tubo dispensador	8	Faculdade de Ensino Superior
	<b>21P</b>	Tubo dispensador	5	Empresa de distribuição de correio postal
	<b>40P</b>	Tubo dispensador	15	Unidade do Exército Português
Gram +	<b>E1</b>	Água	17	Loja de Desporto Multinacional
	<b>E22</b>	Tubo dispensador	10	Empresa de <i>Call Center</i>
	<b>E60</b>	Tubo dispensador	15	Unidade do Exército Português
	<b>S41</b>	Dispensador de copos	9	
	<b>S43</b>	Dispensador de copos	9	Empresa de distribuição de produtos farmacêuticos
	<b>S50</b>	Dispensador de copos	9	

Legenda: O código atribuído significa a inicial da espécie. A letra P diz respeito a pseudomonas, E a enterococos e S a estafilococos seguida do número atribuído à colónia.

#### 4. RESULTADOS QUALITATIVOS *VERSUS* RESULTADOS QUANTITATIVOS

Com a elaboração do diagrama de dispersão, averiguámos se existia alguma relação entre os resultados das supervisões e as contagens de microrganismos. É intuitivo pensar que com maiores percentagens de “não conformidades”, poderá haver lugar a maior crescimento microbiano, mas como visto anteriormente, os pontos não se referem apenas a aspetos de segurança microbiológica e a dependência tende a ser mais forte se vistas sobre uma variedade mais ampla de valores, que não foi o caso, principalmente nos estafilococos. A análise possível, demonstrou no geral, uma correlação negativa e significativa para todos os microrganismos, exceto para estafilococos e pseudomonas. No caso dos estafilococos os dados apresentam apenas um valor, e no caso das pseudomonas, a dependência apesar de positiva, não foi significativa ( $p < 0,05$ ), (Figura 6).

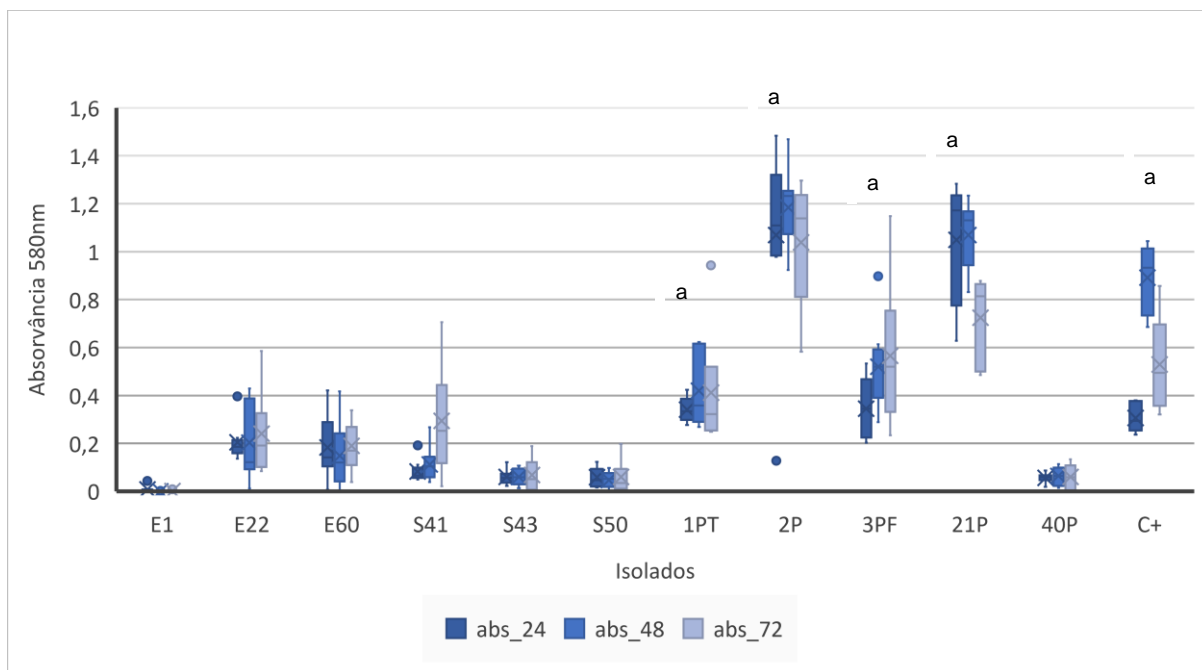


**Figura 6 - Gráfico de dispersão entre as variáveis analisadas: Contagens de *Pseudomonas* spp. versus percentagem de “não conformidades”.**

## 5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PATOGENICO

Os resultados das médias das absorvâncias e respetiva classificação para a capacidade de produção de biofilme, está apresentado na Figura 7.

Estatisticamente, os resultados globais apresentaram alguma variabilidade pelo que a análise das *box-plots* demonstrou a existência de *outliers*, assimetria e valores de desvio padrão elevados, em alguns dos casos. As condições de incubação, as técnicas de lavagem e inoculação, podem estar na causa da variabilidade.



**Figura 7 – Medição da formação de biofilme dos isolados obtidos através dos valores de absorvância.** Legenda: Diferença significativa com base no teste ANOVA Medidas Repetidas ( $p < 0,05$ ) representado pela letra a. A letra P diz respeito a Pseudomonas, E a Enterococos e S a estafilococos, com referência ao número da colônia antes ou depois. A designação PF e PT, no caso das pseudomonas, tem a ver com a distinção relativamente a outros isolados, cuja numeração era igual, por isso adicionou-se a letra referente ao nome da instituição e/ou empresa. Os limites inferiores e superiores da caixa são o primeiro e o terceiro quartis, respetivamente, mediana (barra horizontal central), média (cruz) e limites superior e inferior (linhas verticais) e outliers (ponto), valores que saem fora do valor da região adjacente. Para a classificação: não produtor biofilme  $DO \leq DO$  controlo negativo ( $DO_{cn}$ ); Fraco produtor de biofilme  $DO_{cn} < DO \leq 2DO_{cn}$ ; Médio produtor de biofilme  $2DO_{cn} < DO \leq 4DO_{cn}$ ; Forte produtor de biofilme  $\geq 4DO_{cn}$ .

De acordo com a classificação de Stepanovic, o grupo das pseudomonas teve um papel de destaque na formação de biofilme; quatro dos isolados, produziram biofilme em média e forte extensão à exceção do isolado 40P, que foi classificado como “não produtor”. No grupo dos enterococos e estafilococos, E1, S43 e S50 não produziram biofilme e os isolados E22, E60 e S41, produziram biofilme em baixa quantidade, sendo classificados como “fracos produtores”. Para a classificação final, considerou-se a absorvância ao longo do tempo e os resultados estatísticos foram concordantes na medida em que os isolados classificados como médios e fortes produtores, obtiveram valor de p (probabilidade de significância) inferior a 0,05 (Anexo VII).

Os resultados obtidos podem ter sido influenciados por vários fatores. Um dos fatores é a temperatura de incubação, na medida em que alguns estudos afirmam que a formação de biofilme é maior em condições de crescimento próximas das de crescimento ótimo (Rode et al. 2007). A temperatura do ensaio foi de 25 °C, e sendo as pseudomonas microrganismos psicotrófilos, podem ter apresentado maior capacidade de adaptação. Se a água de fornecimento estiver contaminada, estas poderão crescer com maior expressão nas condições de temperatura das máquinas. Quando analisado o comportamento da absorvância ao longo do tempo, verificou-se um desenvolvimento lento do S41 e E60, com tendência a

aumentar às 72 h de incubação. Estes comportamentos podem ser explicados pelas características intrínsecas dos microrganismos, pela presença de determinados genes e pelos fatores relacionados com o meio. Tanto nos isolados de estafilococos como nos enterococos, o perfil demonstrado pode ter sido causado pela ausência ou falha na expressão génica de fatores como adesinas e outras proteínas de superfície (Valle et al. 2003). Para além disso, os estafilococos não apresentam estruturas de locomoção o que pode ter atrasado a adesão inicial à placa. Estudos efetuados através da adesão microbiana ao teste de solvente, vêm corroborar o resultado da maior adesão por parte das pseudomonas, que, comparativamente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, apresentam mais locais hidrofóbicos à sua superfície, apesar de a hidrofobicidade aumentar com o período de incubação nas três espécies (Mirani et al. 2018). No caso das pseudomonas, verificou-se um crescimento inicial rápido e às 72 h, um decréscimo acentuado. *Pseudomonas* spp., são organismos de crescimento rápido, muito versáteis e à parte disso, apresentam apêndices celulares como flagelos, píli e fimbrias que são extremamente importantes no processo de adesão (Lejeune 2003). A queda abrupta às 72 h, deveu-se provavelmente à elevada atividade metabólica inicial que poderia ter reduzido a sua taxa de crescimento e induzido o desprendimento (Karatan & Watnick 2009). Também está descrito por (Quatrin et al 2015) que ensaios realizados em sistemas fechados não permitem a renovação dos nutrientes e a remoção das substâncias tóxicas oriundas do metabolismo celular acumulam-se no meio.

É importante referir que existem fatores que podem afetar os resultados deste ensaio que não a capacidade de um organismo aderir à superfície, por exemplo, um defeito de crescimento pode facilmente ser confundido com a falta de capacidade de fixação (Merritt et al. 2005). Vejamos o exemplo do nosso controlo positivo. Este deveria ter apresentado elevada capacidade de formação de biofilme, mas nos ensaios realizados isso não aconteceu; os valores de absorvância classificaram-na como “produtora média” de biofilme. As constantes repicagens, temperatura de armazenamento e principalmente o tempo de armazenamento, podem ter tido um efeito prejudicial. O intervalo de tempo desde o seu isolamento até à inoculação na placa, foi de cerca de quatro meses, devido ao isolamento decretado pelo governo em resposta ao aparecimento a nível mundial da doença Covid- 19. Relativamente aos resultados associados à resistência antimicrobiana, estes apresentam-se na Tabela 8.

**Tabela 8 - Perfil de sensibilidade dos isolados a antibióticos de nove classes diferentes.**

Antibiótico Dose	Bactérias										
	GRAM +						GRAM -				
	<i>Enterococcus</i> spp.			<i>Staphylococcus</i> spp.			<i>Pseudomonas</i> spp.				
	E1	E22	E60	S41	S43	S50	1PT	2P	3PF	21P	40P
<b>Aztreonam 30</b>	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R	R
<b>Ceftazidima 30</b>	-	-	-	-	-	-	R/1	S/1	S/1	S/1	R/1
<b>Ciprofloxacina 5</b>	-	-	-	S	S	S	-	-	-	-	-
<b>Clindamicina 2</b>	-	-	-	S	S	S	-	-	-	-	-
<b>Cloranfenicol 30</b>	S/*	S/*	S/*	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Estreptomicina300</b>	S/S	S/S	S/S	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gentamicina 10</b>	-	-	-	S	S	S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
<b>Gentamicina 120</b>	S/S	S/S	S/S	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Imipenem 10</b>		-	-	-	-	-	R	R	R	R	S
<b>Quinusprintina Dalfopristina 5</b>	I/R	I/R	I/R	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Rifampicina 5</b>	-	-	-	S	S	S	-	-	-	-	-
<b>Trimetoprima - Sulfametoxazol25</b>	-	-	-	I	S	S	-	-	-	-	-
<b>Vancomicina 30</b>	S/S	I/S	I/S	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: CLSI/EUCAST- versão 2019 (R-resistente, I-intermédio, S-sensível, - Não efetuado, \* *Breakpoint* não estabelecido, 1 Dose diferente);

O fenótipo observado para os estafilococos, revelou na sua maioria, sensibilidade aos antibióticos testados, indicando falta de expressão de mecanismos de resistência, contudo o isolado S41, apresentou sensibilidade intermédia para trimetoprima -sulfametoxazol, o que constitui risco acrescido para possível falha terapêutica, na medida em que este antibiótico constitui uma das mais recentes alternativas terapêuticas para controlar doenças infecciosas graves em humanos, nomeadamente as de tratamento causadas por estafilococos MRSA (Harris et al. 2018). O isolado S41, também foi o único isolado do grupo a apresentar hemólise do tipo alfa, o que indica que este isolado, se apresentou é potencialmente mais patogénico que os restantes. Na literatura, este resultado pode indiciar possível origem humana, visto que os isolados humanos são mais frequentemente classificados como alfa hemolíticos, mas as estirpes de origem animal também podem apresentar este fenótipo, contudo em frequências mais variáveis (Aarestrup et al. 1999; Hummel et al. 1992) .

Relativamente aos enterococos, o isolado E1, com origem na água, apresentou um perfil de sensibilidade ligeiramente mais elevado, quando comparado com os isolados do grupo. Este resultado em conjunto com o da capacidade de formação de biofilme, poderá classificá-lo como o menos patogénico, contudo a sua caracterização está incompleta na medida em que a atividade hemolítica não foi possível de avaliar devido às questões temporais e disponibilidade de meios específicos.



Em relação à vancomicina, os resultados diferem conforme o sistema de classificação utilizado. EUCAST classifica-os a todos como sensíveis, e de acordo com os critérios do CLSI, os isolados E22 e E60, são intermédios. Esta última interpretação dos resultados é importante dada a literatura referenciar os enterococos resistentes à vancomicina (VRE), como uma preocupação séria na terapêutica de infeções causadas por estes microrganismos (Giraffa, 2002), embora a sua prevalência esteja a baixar em Portugal nos últimos anos. No caso do antibiótico quinusprintina – dalfopristina (Q-D), o perfil apresentado pode sugerir que se trate da espécie *E. faecalis*. dado o resultado, de acordo com a EUCAST, classificá-los como resistentes e segundo o CLSI, intermédios. Estando Portugal inserido na Comunidade Europeia, os critérios EUCAST serão mais apropriados à interpretação, e são preocupantes na medida em que as estreptograminas são atualmente uma das terapêuticas utilizadas em substituição da vancomicina, para o tratamento de infeções provocadas por enterococos VRE da espécie *E. faecium*, pois no caso do *E. faecalis*, são intrinsecamente resistentes como já referido (Linden 2002; Mendes et al. 2002). Este dado pode sugerir que os isolados recuperados pertencem à espécie *E. faecalis*, o que seria expectável, visto serem uma das espécies mais frequentes. A discrepância nos pontos de interrupção clínicos entre o CLSI e EUCAST, pode influenciar a seleção antimicrobiana por parte dos profissionais de saúde e tem implicações não apenas para os antibiogramas nas instituições que alternam entre os dois sistemas, mas para iniciativas mais amplas de vigilância da resistência antimicrobiana comparando dados dentro e entre países que utilizam sistemas diferentes ou durante o período durante o qual uma mudança de metodologia é implementada. Pontos de interrupção clínicos globalmente harmonizados são urgentemente necessários. Todos os isolados do grupo, apresentaram sensibilidade ao cloranfenicol e aos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos; algo positivo dado serem utilizados sinergicamente com a vancomicina no tratamento de infeções (Linden 2002). No teste à capacidade hemolítica, nenhum isolado apresentou produção de hemolisina. Se se tratassem de enterococos hemolíticos, teriam apresentado uma beta-hemólise bem visível no sangue de cavalo (Liofilchem S.r.l, 2018).

O perfil de resistência das pseudomonas foi o mais elevado, pelo que 100% apresentou resistência ao aztreonam e 80% ao imipenem. Os isolados 2P, 3PF e 21P foram sensíveis à ceftazidima, mas os isolados 40P e 1PT mostraram resistência. Apesar da resistência do isolado 1PT ser evidente a antibióticos de pelo menos três classes, o alvo é o mesmo, portanto não a podemos classificar como multirresistente (MDR). De acordo com a literatura, o resultado enquadra-se em parte com o que se tem vindo a conhecer acerca da espécie, isto é, que são naturalmente resistentes a vários antibióticos devido à barreira impermeável oferecida pela membrana exterior lipopolissacarídea (LPS), à existência natural das enzimas beta-lactamases e à ação de bombas de efluxo, que são componentes comuns

do fenótipo de resistência para algumas classes de antibióticos como os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas (ECDC 2019)

A elevada resistência verificada aos beta-lactâmicos, imipenem e aztreonam, é preocupante, na medida em que o imipenem é um antibiótico de largo espectro e normalmente a sua aplicação é considerada apenas em último recurso e no caso do aztreonam, este é utilizado em casos em que pacientes são alérgicos à penicilina (Neves et al. 2011). Nestes isolados é provável que a expressão dos genes para a codificação das bombas de efluxo MexAB-oprM e MexEF-oprN, esteja aumentada (Ziha-Zarifi et al. 1999), o que lhe confere ainda mais potencial patogénico se adicionarmos o fato de serem “médias” e “fortes produtoras” de biofilme. No caso do 40P, apesar da produção de biofilme ter sido inexistente, apresentou resistência à ceftazidima tal como o isolado 1PT. A ceftazidima é um antibiótico de terceira geração, que lhe confere vantagem em relação a outras cefalosporinas. Na produção de biofilmes, a interação entre a população de células e os antibióticos pode levar à sobreexpressão de um ou outro gene em particular, levando à heterogeneidade de resultados (Ziha-Zarifi et al. 1999).

No que se refere ao resultado para a gentamicina, a sensibilidade verificada por todos os isolados, representa um ponto positivo por ainda ser possível tratar as infeções pela aplicação dos fármacos atrás referidos em associação com este e outros aminoglicosídeos.

Relativamente à capacidade hemolítica, o isolado 1PT, após incubação a 37 °C, não apresentou zonas de hemólise, mas após refrigeração a 4 °C, a hemólise ocorreu. Este é um fenómeno designado por “*hot cold*” em que os eritrócitos pré-incubados a 37 °C, na presença de certos agentes, sofrem rápida hemólise quando transferidos para temperaturas de refrigeração (Montes et al. 2008) e para ocorrer têm de estar presentes a esfingomielase e a fosfolipase C, dois fatores de virulência codificados pelo gene *plchr2*. O mecanismo ainda não está bem esclarecido, mas sabe-se que no caso dos eritrócitos de cavalo, meio onde o teste foi efetuado, a hemólise não ocorre, o que é contrário ao observado no nosso estudo. No caso dos eritrócitos de cavalo, a proporção de esfingomielina é muito baixa, e pelo contrário, a da fosfatidilcolina é alta. Nos eritrócitos humanos, a proporção é igual, portanto supõe-se que se houve lise nos eritrócitos de cavalo, poderá ocorrer lise nos eritrócitos humanos.

O isolado 2P, por outro lado, apresentou hemólise parcial e este facto coloca-o como o isolado com maior potencial patogénico em comparação aos restantes, pela presença de outros fatores de virulência em paralelo estudados no presente estudo, (elevada capacidade de produção de biofilme e elevado perfil de resistência a antibióticos).

## V CONCLUSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo inspecionar as máquinas dispensadoras de bebidas quentes de acordo com a *check list* definida pela empresa, e pesquisar a presença de microrganismos potencialmente patogênicos. Secundariamente, propusemo-nos avaliar o potencial de patogenicidade pela análise da formação de biofilme, resistência a antibióticos e capacidade hemolítica e averiguar a existência de correlação entre as “não conformidades” das inspeções e os resultados microbiológicos.

Numa primeira análise, os resultados obtidos nas inspeções efetuadas às máquinas dispensadoras de bebidas quentes foram considerados satisfatórios, não existindo correlação entre estes e os resultados microbiológicos. No decorrer do estudo, concluiu-se serem vários os fatores envolvidos no tipo e quantidade de microrganismos encontrados e o fato de haver pontos relacionados com aspetos técnicos e sanitários, não permite uma correlação clara e direta entre as percentagens de “não conformidades” e a presença de microrganismos. Os resultados da medição da temperatura, permitiram concluir que a média de valores poderá resultar no crescimento de microrganismos mesófilos, dos quais fazem parte a maioria dos microrganismos patogênicos e o estudo comprovou a presença de microrganismos potencialmente patogênicos e deteriorantes no leite em pó, na água e superfícies críticas. Pela análise do parâmetro da humidade relativa, valores elevados podem comprometer o estado geral dos produtos e potenciar o crescimento microbiano, pelo que concluímos que devem ser asseguradas condições de higiene e ventilação na instalação dos equipamentos. Os microrganismos predominantes nas máquinas dispensadoras de bebidas quentes foram os fungos e as leveduras. A presença destes microrganismos, para além de poder estar relacionada com as condições ótimas de crescimento e grande adaptabilidade a condições adversas, são indicadores de falhas no processo de higienização e podem representar um perigo, na medida em que os fungos podem ser produtores de micotoxinas. Por outro lado, apesar dos *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp., não terem apresentado uma ocorrência significativa, alguns resultados revelaram-se insatisfatórios do ponto de vista legal e a constatação de elevadas contagens de *Staphylococcus* spp., podem representar um risco acrescido ao sistema público de saúde dada a sua elevada frequência e o fato de formarem biofilmes e serem extremamente difíceis de tratar. A constatação da presença de colónias presuntivas de *Pseudomonas* spp. com elevada capacidade de produção de biofilme e resistência a antibióticos, no tubo dispensador, veio a constituir o resultado mais importante e mais uma vez, os dados apontam para uma necessidade imperiosa de se implementarem boas praticas de higiene e rever pré-requisitos, uma vez que poderá estar presente um fator de risco em termos de contaminações cruzadas. Face aos resultados apresentados, alguns melhoramentos são pertinentes. A adoção de dois *check-lists*, um com pontos exclusivamente sanitários e outro para verificação de aspetos técnicos, privilegiando a abordagem dos temas

em separado e de forma mais consistente na formação dos colaboradores. O fornecimento da água terá de ser sempre de fonte segura e nos casos onde a água apresente níveis elevados de calcário, deveremos aplicar sistemas de filtragem para diminuir a deposição de calcário nas caldeiras que causam leituras erradas. Sugere-se adequar a periodicidade da limpeza a equipamentos como o tubo dispensador.

Os resultados deste trabalho inicial e exploratório, sugerem que a utilização de máquinas dispensadoras de bebidas quentes podem não constituir um risco em termos de toxinfecções alimentares, dado a maior parte dos isolados obtidos terem apresentado reduzido potencial patogénico, mas podem representar um risco para a disseminação de resistência antibiótica, pela presença de pseudomonas resistentes a antibióticos e, produtoras de biofilme, sendo o tubo dispensador um local propício ao seu desenvolvimento. Apesar do número de amostras pouco representativo, este trabalho levantou algumas questões importantes ao nível da segurança alimentar e importância da implementação dos pré-requisitos. Os resultados obtidos permitiram

Como perspectiva de trabalho futuro, no seguimento deste estudo inicial e exploratório, seria interessante continuar a efetuar análises, nomeadamente ao nível da identificação molecular dos isolados e pesquisa de genes, responsáveis por fatores de virulência. Seria importante avaliar o impacto da presença dos fungos pela identificação das respetivas espécies e verificação da capacidade de produção de micotoxinas, e avaliar a formação de biofilmes e a eficácia dos desinfetantes utilizados. O número de amostras acabou por ser apenas indicativo, são necessárias mais amostras e será importante acompanhar os resultados de modo a estabelecer indicadores específicos para o plano HACCP da empresa. De referir que durante o ano que se seguiu, com a inesperada chegada da Covid-19, o consumo caiu abruptamente pelo encerramento de empresas e dado o contacto próximo entre o utilizador e as máquinas dispensadoras de bebidas quentes, os meios de limpeza e desinfeção tiveram de ser ainda mais rigorosos para oferecer maior segurança e confiança ao utilizador. Seria interessante efetuar análises nesta fase e comparar resultados.

## VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup, F. M., Larsen, H. D., Eriksen, N. H., Elsberg, C. S., & Jensen, N. E. (1999). Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin: a comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *Acta Patol. Microbiol. Immun. Scand.*107(4): 425–430.
- Abdul-Mutalib, A. N., Osman, M., & Nordin, S. A. (2019). Prevalence of spoilage microorganism, *Pseudomonas* spp. on restaurants cutting boards collected in Seri Kembangan, Malaysia. *J.Food Sci.Nut.*2 (2): 7-12.
- Al - Atrash, M. (2019). Investigation of microbial contamination of powdered infant formula during different storage periods after opening. *Int.J.Pharm.Qual.Assur.* 10. <https://doi.org/10.25258/ijpqa.10.3.21>
- Al Sakkaf, A., & Jones, G. (2012). Thermal inactivation of *Campylobacter jejuni* in broth. *J.Food Prot.*75(6): 1029–1035. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-518>
- Allam, H., Al-Batanony, M., Seif, A., & Awad, E. (2016). Hand contamination among food handlers. *Br. Microbiol. Res. J.* 13: 1–8. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2016/24845>
- Almeida, D. M. S. (2013). Contaminação microbiológica de alimentos: o caso particular de *E. coli* . Dissertação de Mestrado em bioquímica, Universidade de Aveiro.
- Anderson, G. G., & O'Toole, G. A. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 322: 85–105. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_5)
- Arronches, A. (2014). Pesquisa de resistência a antibióticos em alguns enterococos intestinais provenientes de diferentes amostras de águas. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biológica, Instituto Superior Técnico.
- Augustin, M. A., Clarke, P. T., & Craven, H. (2003). Powdered milk -Characteristics of milk powders. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2ª Ed) Caballero (ed.); 4703–4711. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00956-1>
- Baird-Parker, A. C. (1990). The staphylococci: an introduction. *J.Appl.Bacteriol.* 69 (S19):1S-8S <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01793.x>.
- Baptista, P. (2003). Higienização de equipamentos e instalações na indústria Agro-alimentar. Em *Forvisão - Consultoria em Formação Integrada* (Eds.), Segurança

Alimentar na Industria Agro-Alimentar (1ª Ed),68).

- Baptista, P., & Antunes, C. (2005). Higiene e segurança alimentar na restauração- Volume II-Avançado. Forvisão-Consultoria em formação integrada (Ed.), SA (1ª ed, 300.
- Batt, C. A., Tortorello, M.L. (2014). *Escherichia coli*. Enciclopédia, Encyclopedia of Food Microbiology: (2ª Ed). Academic Press; [Acessado em 07 de Setembro de 2020] <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00100-2>
- Batté, M., Appenzeller, B. M. R., Grandjean, D., Fass, S., Gauthier, V., Jorand, F., Mathieu, L., Boualam, M., Saby, S., & Block, J. C. (2003). Biofilms in drinking water distribution systems. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2(2):147–168.
- Beecher, D. J., & Wong, A. C. L. (1997). Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus* hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J. Biolog. Chem.* 272(1):233–239.
- Bellis, M. (2020). *The History of Vending Machines*. Thought.Co. <https://www.thoughtco.com/the-history-of-vending-machines-1992599>
- Benie, C., G, N., Dadie, A., Aka, S., Fernique, K., Désiré, K., B, B., DK, M., & D, M. (2017). Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine meat, fresh fish and smoked fish. *Arch. Microbiol.* 08. <https://doi.org/10.4172/1989-8436.100040>
- Bocelli, M. D. (2016). Estudo da atividade de chalconas no controlo de biofilmes bacterianos. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica e Biológica, Instituto de Química, Universidade de S.Paulo.
- Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14(4): 327–335. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(00\)00145-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00145-x)
- Bolton, D. J., Ivory, C., & McDowell, D. (2013). Thermal inactivation of *Yersinia enterocolitica* in pork slaughter plant scald tank water. *Meat Sci.* 95(3): 668 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.034>
- Bomberger, J. M., MacEachran, D. P., Coutermarsh, B. A., Ye, S., O'Toole, G. A., & Stanton, B. A. (2009). Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* 5(4):

e1000382.

Bovermann, B. (2017). *Bacillus cereus* contamination in coffee makers at several Bundeswehr dining and recreational facilities. *Wehrmed. Monatsschr.* 61: 42–49.

Bucior, I., Pielage, J. F., & Engel, J. N. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathog.* 8(4): e1002616.

[CAC] Codex Alimentarius Commission. (2003). General Principles of Food Hygiene. *Codex Alimentarius Commission*, 1–31.[Acessado em 03 de Fevereiro de 2020]. <http://www.fao.org/>

Cardaci, Rosa; Burgassi, Sandra; Golinelli, Davide; Nante, Nicola; Bezzini, Daiana; Messina, Gabriele; Battaglia, M. (2017). Automatic vending-machines contamination: A Pilot Study. *Rev. Glob. da Ciência da saúde.* 9(2), 63–66 <http://dx.doi.org/10.5539/gjhs.v9n2p63>

Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Mex Patol Clin Med Lab.*61(1): 28–40.

Chaidez-Quiroz, C., Rusin, P., Naranjo, J., & Gerba, C. (1999). Microbiological quality of water vending machines. *Int. J. Environ. Health Res.* 9: 197–206 <https://doi.org/10.1080/09603129973164>.

Chang, G. W., Brill, J., & Lum, R. (1989). Proporção de beta-D-glucuronidase-negativo *Escherichia coli* em amostras fecais humanas. *Microbiol. Apl. Amb*, 55(2), 335-339. <https://doi.org/10.1128/aem.55.2.335-339.1989>

Chaves, L. C. D. (2004). Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável. Dissertação de Mestrado em Tecnologia do Ambiente, Universidade do Minho.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2019). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (29.<sup>a</sup> ed.). Wayne, PA.

Comissão Europeia. (2016). Comunicação HACCP. *J. Of. da União Eur.* 2016/C 278/1.

Coote, P. J., Holyoak, C. D., & Cole, M. B. (1991). Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during a process simulating temperatures achieved during microwave heating. *J Appl Bacteriol*, 70(6): 489–494.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02745.x>

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms: Annu. Rev. Microbiol. 49: 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>.

Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., & Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect. Immun. 67(10):5427–5433.

Craveiro, C., Real, H., & Cardoso, F. (2018). Segurança Alimentar: Princípios Básicos. Associação Portuguesa de Nutrição (APN), 32–43.[Acessado em 07 de Setembro de 2020]. <http://www.revista-fi.com>

Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., & Samson, R. A. (2009). CBS Laboratory Manual Series. CBS-KNAW Fungal Biodivers. Centre, Utrecht, Netherlands.

Dakroub, R., & Na'was, T. (2017). Vending Machine Buttons and Touch Screens: A Surface Colonized by Pathogenic Bacteria. Int. J. Innov. Appl. Res. 5:82–88.

Decreto-Lei nº 24/2014 de 14 de Fevereiro. (2014). Contratos celebrados à distância e fora do estabelecimento comercial. Diário da República n.º 32/2014, Série I 1393–1403. Ministério da Economia.

Decreto Lei nº 156/98 de 6 de Junho. (1998). Regras relativas ao reconhecimento das águas minerais naturais e as características e condições a observar nos tratamentos, rotulagem e comercialização das águas minerais naturais e águas de nascente. Diário da República n.º 131/1998, Série I-A (2593–2599). Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Decreto Lei nº 306/2007 de 5 de Setembro. (2007). Estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano. Diário da República n.º 164/2007, Série I de 2007-08-27 (5747–5765). Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.

Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 8(9): 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.

Dourou, D., Beauchamp, C. S., Yoon, Y., Geornaras, I., Belk, K. E., Smith, G. C., Nychas, G.-J. E., & Sofos, J. N. (2011). Attachment and biofilm formation by



- Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *Int. J. Food Microbiol.* 149(3): 262–268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.004>
- Downes, F. P., & Ito, K. (2001). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. J. Am. Public Health Assoc. Washington DC, USA
- [ECDC] European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. <https://doi.org/10.2900/22212>.
- [EUCAST] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2019). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 9.0, valid from 2019-01-01. <http://www.eucast.org>.
- [EVA], European Vending & Coffee Service Association (2019a). The Vending Market in 2018- Portugal.
- [EVA], European Vending & Coffee Service Association (2019b). The Vending Market in 2018-Europe.
- Facklam, R. R., Carvalho, M. da G. S., & Teixeira, L. M. (2002). History, taxonomy, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility testing of enterococci. Book *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance* (eds M.S. Gilmore, D.B. Clewell, P. Courvalin, G.M. Dunny, B.E. Murray and L.B. Rice). 1–54.
- [FAO] Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (2020). Resistência antimicrobiana- Segurança Alimentar.[Acessado em 07 de Setembro de 2020]. <http://www.fao.org/antimicrobial-resistance/key-sectors/food-safety/en/>
- Feßler, A. T., Kadlec, K., Hassel, M., Hauschild, T., Eidam, C., Ehricht, R., Monecke, S., & Schwarz, S. (2011). Characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(20): 7151 LP – 7157. <https://doi.org/10.1128/AEM.00561-11>
- Fiedler, G., Schneider, C., Igbinosa, E. O., Kabisch, J., Brinks, E., Becker, B., Stoll, D. A., Cho, G.-S., Huch, M., & Franz, C. M. A. P. (2019). Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. *J. Biomed. Cent. Microbiol.* 19(1):250. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1632-2>

- Fior, B., Zanol, D., Okano, W., Bogado, A. L. G., Helena, E., de Santana, W., & Silva, L. C. (2014). Equine plasma use in the capacity of detection of the enzyme coagulase produced by *Staphylococcus* spp. *Rev. Bras.hig. sanid. anim.* 8(5): 330–339.
- Flach, J; Karnopp, C; Corção, G. (2005). Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Sci. Vet.*33: 291–296.
- Fotadar, U., Zaveloff, P., & Terracio, L. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *J.Basic. Microbiol.* 45: 403–404.  
<https://doi.org/10.1002/jobm.200410542>
- Fox, L. K., Besser, T. E., & Jackson, S. M. (1996). Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. *J. AM. Vet. Med. A.* 209(6):1143–1146.
- Franz, C. M. A. P., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M. K., Vancanneyt, M., Swings, J., & Holzapfel, W. H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(9): 4385 LP – 4389. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4385-4389.2001>
- Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., & Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods: A conundrum for food safety. *J. Food Microbiol.*88(2–3): 105–122.
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front. Microbiol.* 9:898.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
- Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol.Lett.* 205(1): 31–36.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10921.x>
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiol.Rev.* 26(2): 163–171.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x>
- Goepfert, J. M., Spira, W. M., & Kim, H. U. (1972). *Bacillus cereus*: Food poisoning organism: A review. *J. Milk Food Technol.* 35(4): 213–227.  
<https://doi.org/10.4315/0022-2747-35.4.213>
- Götz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43(6):1367–1378.
- Gräf, W., & Mönius, W. (1977). Transmission of staphylococci from the nose to hands and eye-glasses as a nosocomial problem. *Zentralbl Bakteriol. Orig. B.* 164(1–2):

127–137.

- Granum, P. E., & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol.Lett. 157(2): 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x>
- Griffiths, M. W., & Schraft, H. (2017). Chapter 20 - *Bacillus cereus* food poisoning (C. E. R. Dodd, T. Aldsworth, R. A. Stein, D. O. Cliver, & H. P. B. T.-F. D. (3<sup>a</sup> Ed). Riemann (eds.); pp. 395–405). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00020-6>
- Guerra, A. F. (2016). Microbiologia de Alimentos. Métodos de Contagem Microbiana. (1<sup>a</sup> Ed.), 28. [www.microbiologia-de-alimentos.com](http://www.microbiologia-de-alimentos.com)
- Hall, A., Short, K., Saltmarsh, M., Fielding, L., & Peters, A. (2007). Development of a microbial population within a hot-drinks vending machine and the microbial load of vended hot chocolate drink. J. Food Sci. 72(7):M263-6. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00473.x>
- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S. J., & Tolker-Nielsen, T. (2010). An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. Immun. Med. Microbiol. 59(3), 253–268. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x>
- Harris, T. M., Bowen, A. C., Holt, D. C., Sarovich, D. S., Stevens, K., Currie, B. J., Howden, B. P., Carapetis, J. R., Giffard, P. M., & Tong, S. Y. C. (2018). Investigation of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in an emerging sequence type 5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone reveals discrepant resistance reporting. Clin Microbiol Infect. 24: 1027–1029.
- Hashempour-Baltork, F., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., Torbati, M., Alizadeh, A. M., & Alizadeh, M. (2019). Drug resistance and the prevention strategies in food borne bacteria: An Update Review. Adv. Pharm. Bull. 9(3): 335–347. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.041>
- Hayrapetyan, H., Tempelaars, M., Nierop Groot, M., & Abee, T. (2015). *Bacillus cereus* ATCC 14579 RpoN (Sigma 54) is a pleiotropic regulator of growth, carbohydrate metabolism, motility, biofilm formation and toxin production. PloS One, 10(8): e0134872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134872>
- Hazen, KC; Howell, S. (2003). Candida, Cryptococcus and other yeasts of medical importance. Em P. Murray (Ed.), Manual of Clinical Microbiology (8.<sup>a</sup> ed.).

- Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.-L., & Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol.Rev.* 36(4):815–836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>
- Hilliard, N. J., Schelonka, R. L., & Waites, K. B. (2003). *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. *J. Clin.Microbiol.* 41(7),:3441–3444.
- Holbrook, R., & Anderson, J. M. (1980). An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Can. J. Microbiol.* 26(7): 753–759.
- Houben, J. H. (2003). The potential of vancomycin-resistant enterococci to persist in fermented and pasteurised meat products. *Int. J. Food Microbiol.*88(1): 11–18.
- Hummel, R., Devriese, L. A., & Lehmann, G. (1992). Characteristics of bovine *Staphylococcus aureus* with special regard to clumping factor activity. *Zentralblatt Bakteriol B.* 276(4): 487–492.
- Hunter, P. R., & Burge, S. H. (1986). Bacteriological quality of drinks from vending machines. *Am. J. Hyg.* 97(3):497–500. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0022172400063683>
- Iglewski, B. H. (1996). *Pseudomonas*. Book S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4.<sup>a</sup> ed.) capítulo 27. Galveston
- International, T. (2019). *Mangueiras e acessórios para a indústria*. [Acessado em 20 de Janeiro de 2020] <https://www.tubes-international.com/products/industrial-hoses-delivery-and-suction-hoses/silicone-hoses-and-silicone-tubings/>
- [ISO] International Organization for Standardization 7218. (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*. 3<sup>a</sup> Ed., *Microbiologia Alimentar*, 66.
- [ISO] International Organization for Standardization 13720. (2010). *Meat and meat products — Enumeration of presumptive *Pseudomonas* spp.* International. 2<sup>a</sup> Ed., *Microbiologia Alimentar*, *Produtos de carne*, 7.
- [ISO] International Organization for Standardization 16649:2. (2001). *Microbiologia de alimentos e alimentos para animais — Método horizontal para a enumeração de beta-glucuronidase-positivo *Escherichia coli* — Parte 2: Técnica de contagem de colônias a 44 graus usando 5-bromo-4-cloro-3-indolyl beta-D-glucuronida*. 2<sup>a</sup> Ed.,

Microbiologia Alimentar, 11.

[ISO] International Organization for Standardization 21871. (2006). Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the determination of low numbers of presumptive *Bacillus cereus* — Most probable number technique and detection method. 1<sup>a</sup> Ed., Microbiologia Alimentar, 14.

[ISO] International Organization for Standardization 6888:1. (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. 2<sup>a</sup> Ed., Microbiologia Alimentar.

[ISO] International Organization for Standardization 7899:2. (2000). *Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci — Part 2: Membrane filtration method*. 2<sup>a</sup> Ed., Métodos Microbiológicos, Microbiologia da água,7.

Jamal, M., Tasneem, U., Hussain, T., & Andleeb, S. (2015). Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. Research & Reviews: J. Microbiol. Biotechnol. 4: 1–14.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2008). Modern food microbiology. 7<sup>a</sup> Ed., Springer Science & Business Media.

Jie, Q., & Sun. (2009). Curative Effect Observation of Ciprofloxacin Injection in the Treatment of Acute Mastitis on Dairy Cows. Mod. Appl. Sci. 3(3): 112–114.

Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. Int. J. Food Microbiol. 64(3): 367–372. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00466-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00466-9)

Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed Res. Int 2014, 827965. <https://doi.org/10.1155/2014/827965>

Kajal, M., Wadud, A., Islam, M., & Sarma, P. (2012). Evaluation of some chemical parameters of powder milk available in Mymensingh town. J. Bangladesh Agril. Univ. 10. <https://doi.org/10.3329/jbau.v10i1.12099>

Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73: 310–347.

Kim, W., Tengra, F. K., Young, Z., Shong, J., Marchand, N., Chan, H. K., Pangule, R.

- C., Parra, M., Dordick, J. S., Plawsky, J. L., & Collins, C. H. (2013). Spaceflight Promotes Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE*, 8(4), e62437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062437>
- Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N., & Mahadik, K. R. (2009). Biofilm: Importance and applications. *Indian J. Biotechnol.* 8: 159-168.
- Kwon, M., Hussain, M. S., & Oh, D. H. (2017). Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions. *Food Sci. Biotechnol.* 26(4): 1103–1111. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0129-8>
- Lee, J. H. (2003). Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11): 6489–6494. <https://doi.org/10.1128/aem.69.11.6489-6494.2003>
- Lelieveld, H., Gabric, G., & Holah, J. (2005). Handbook of hygiene control in the food industry. (2.<sup>a</sup> ed.). Woodhead publishing limited.
- Lejeune, P. (2003). Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol.* 11(4): 179–184. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00047-7](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00047-7)
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., & Faille, C. (2010). Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, 26(4): 421–431. <https://doi.org/10.1080/08927011003699535>
- Lima, F. L. O., Almeida, P. C., & de Oliveira, G. A. L. (2020). *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina e a sua disseminação em infecções no ambiente hospitalar. *Res. Soc. Dev.* 9(8): e738986404–e738986404.
- Linden, P. K. (2002). Treatment options for vancomycin-resistant enterococcal infections. *Drugs J.* 62(3): 425–441. <https://doi.org/10.2165/00003495-200262030-00002>
- Liofilchem S.r.l. (2018). *Columbia Agar (Sangue de cavalo 5 %)- Ficha técnica* 3–6.
- Loureiro, R. J., Roque, F., Teixeira Rodrigues, A., Herdeiro, M. T., & Ramalheira, E. (2016). O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Rev. Port. de Saude Publica.* 34(1): 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003>

- Luna, C. M., Rodríguez-Noriega, E., Bavestrello, L., & Gotuzzo, E. (2010). Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Bras. J. Infect. Dis.* 14:119–127.
- Mackey, B. M., Pritchett, C., Norris, A., & Mead, G. C. (1990). Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. *Lett. Appl. Microbiol.* 10(6): 251–255.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 18(3): 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Dupré, I., & Sechi, L. A. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 88(2–3):291–304. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00191-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00191-0)
- Marinho, A. R., Dalcin Martins, P., Ditmer, E., d’Azevedo, P., Frazzon, J., Van Der Sand, S., & Frazzon, A. (2013). Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. *Bras.J. Microbiol.* 44: 423–426. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000045>
- Marion, N. E., & Oliver, W. M. (2014). *Drugs in American Society: An Encyclopedia of History, Politics, Culture, and the Law*, 3:1163. ABC-CLIO.
- Matumoto-Pintro, P. T., Murakami, A. E., Vital, A. C. P., Croge, C., da Silva, D. F., Ospina-Roja, I. C., & Guerra, A. F. Q. G. (2017). Effects of storage time and temperature on lipid oxidation of egg powders enriched with natural antioxidants. *Food Chem.* 228:463–468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.044>
- Matuschek, E., Brown, D. F., & Kahlmeter, G. (2014). Desenvolvimento do método de teste de suscetibilidade antimicrobiana de difusão de disco da EUCAST e sua implementa  o em laboratórios de microbiologia de rotina. *Microbiol clín. inf* :

publicação oficial da, ESCMID20(4), O255-O266. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>

McDowell, R. H., Sands, E. M., & Friedman, H. (2020). *Bacillus cereus*. *StatPearls*. Treasure Island (FL), Statpearls Publishing.

Medved'ová, A., & Valík, L. (2012). *Staphylococcus aureus*: Characterization and Quantitative Growth Description in Milk and Raw Milk Cheese Production. Structure and function of food engineering. Ayman Amer Eissa, 71–102.

Mendes, C., Sinto, S. I., Hsiung, A., Oplustil, C., Teixeira, L., Segura, A., Souza, D., Barth, A., & Nicodemo, A. C. (2002). Atividade antimicrobiana in vitro de quinupristina/dalfopristina para cocos gram-positivos isolados de cinco centros brasileiros: resultado do estudo de vigilância. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 38: 191–197.

Meng, L., Liu, H., Lan, T., Dong, L., Hu, H., Zhao, S., Zhang, Y., Zheng, N., & Wang, J. (2020). Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from raw milk revealed by whole genome sequencing. *Front. Microbiol.* 11: 1005.

Merritt, J. H., Kadouri, D. E., & O'Toole, G. A. (2005). Growing and analyzing static biofilms. *Curr. Protoc. Microbiol. Cap. 1: Unit 1B.1*.  
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>

Mirani, Z. A., Fatima, A., Urooj, S., Aziz, M., Khan, M. N., & Abbas, T. (2018). Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Iran. J. Basic. Med. Sci.*, 21(7): 760–769.  
<https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.28525.6917>

Mohamed, J. A., Huang, W., Nallapareddy, S. R., Teng, F., & Murray, B. E. (2004). Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 72(6): 3658–3663.

Monteiro, S. (2016). Avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo comercializadas na região de Lisboa. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa.

Montes, L.-R., López, D. J., Sot, J., Bagatolli, L. A., Stonehouse, M. J., Vasil, M. L., Wu, B. X., Hannun, Y. A., Goñi, F. M., & Alonso, A. (2008). Ceramide-enriched membrane domains in red blood cells and the mechanism of sphingomyelinase-induced hot-cold hemolysis. *Biochemistry*, 47(43): 11222–11230.



<https://doi.org/10.1021/bi801139z>.

- Møretrø, T., & Langsrud, S. (2017). Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 16(5): 1022–1041. <https://doi.org/doi:10.1111/1541-4337.12283>
- Mossel, D. A. A. (1967). Ecological Principles and Methodological Aspects of the Examination of Foods and Feeds for Indicator Microorganisms. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*50(1): 91–104.
- NECIdoVá, L., Vá, B., Karpíš, S., duš, M., & Hygiene, M. (2009). Importance of *Enterococcus* spp. for Forming a Biofilm. *Czech J. Food Sci.* 27.
- Nelms, P. K., Larson, O., & Barnes-Josiah, D. (1997). Time to *B. cereus* about hot chocolate. *Public Health Rep. (Washington, D.C. : 1974)* 112(3): 240–244.
- Neves, P R, McCulloch, J. A., Mamizuka, E. M., & Lincopan, N. (2014). PSEUDOMONAS | *Pseudomonas aeruginosa*. *Enciclopédia de Microbiologia Alimentar (C. A. Batt & M. L. B. T.-E. of F. M. Tortorello (eds.); (2ªEd) 253–260. Academic Press.*
- Neves, Patrícia R, Mamizuka, E. M., Levy, C. E., & Lincopan, N. (2011). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil. *J. Bras. Patol. Med.Lab.* 47(4): 409–420.
- [NP 1084] Norma Portuguesa (1987). Leite em pó- Definição, classificação, características e acondicionamento. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Lisboa.
- [NP 1828] Norma Portuguesa (1982). Microbiologia alimentar- Preparação da amostra para análise microbiológica (p. 3). Instituto Português da Qualidade (IPQ), Lisboa
- [NP 3277:2] Norma Portuguesa (1987). Contagem de bolores e leveduras- Parte 2: Incubação a 37°C. Microbiologia alimentar- Instituto Português da Qualidade (IPQ), Lisboa.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30(2):295–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
- Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., Jiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández-Castro, R., &

- Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas . *Bol. Med.Hosp. Infant. Mex.* 70:136–150.
- Odonkor, S. (2013). *E. coli* as an indicator of bacteriological quality of water: An overview. *Res. J. Microbiol.*4. <https://doi.org/10.4081/mr.2013.e2>
- Oliveira, L. A. T. de, Franco, R. M., Carvalho, J. C. A. do P., Almeida Filho, E. S. de, & Gonçalves, P. M. R. (2006). Biofilme na indústria de alimentos: revisão. *Hig. alim.*33–35.
- [OMS] Organização Mundial de Saúde (2018a). Developing drinking water regulations and standards: General guidance with a special focus on countries with limited resources. *Routledge Handbook of Water and Health*, 658–666.
- [OMS] Organização Mundial de Saúde (2018b). *Escherichia coli*. [Acessado em 07 de Setembro de 2020]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- [OMS] Organização Mundial de Saúde (2020 a). Food Safety.[Acessado em 20 de Janeiro de 2020]. <https://www.who.int/NEWS-ROOM/FACT-SHEETS/DETAIL/FOOD-SAFETY>
- [OMS] Organização Mundial de Saúde (2020b). Global Priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Acessado em 20 de Janeiro de 2020].
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*-the «accidental» pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.*7(8):555–567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>.
- Oxoid (2021a). *Pseudomonas Agar* - Ficha técnica. [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0559&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0559&c=UK&lang=EN)
- Oxoid (2021b). *Rose-bengal Dicloran Agar*-Ficha técnica. [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1148&c=UK&lang=EN&org=&print=N](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1148&c=UK&lang=EN&org=&print=N)
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.*37,(1):177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas*

- aeruginosa and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3(2):255–264.
- Prakash, B., Veeregowda, B. M., & Krishnappa, G. (2003). Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Curr. Sci.* 1299–1307.
- Quatrin, P. M., Comim, V. M., Lopes, L. Q. S., Gündel, A., de Almeida Vaucher, R., & Santos, R. C. V. (2015). Avaliação de diferentes substratos para a formação de biofilmes in vitro de *Pseudomonas aeruginosa*. *Discip. Sci. Saúde.*16(2): 191–203.
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., & López-Ribot, J. L. (2005). *Candida* biofilms: An update. *Eukaryot. Cell.*4(4): 633-8638.  
<https://doi.org/10.1128/EC.4.4.633-638.2005>
- Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., & Lopez-Ribot, J. (2009). Our Current Understanding of Fungal Biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.*35(4)340–355. 355.  
<https://doi.org/10.3109/10408410903241436>
- Raposo, A., Carrascosa, C., Pérez, E., Saavedra, P., Sanjuán, E., & Millán, R. (2015). Vending machines: Food safety and quality assessment focused on food handlers and the variables involved in the industry. *Food Control.* 56:177–185.
- Raposo, A. J. de A. S. (2013). *Avaliação da segurança alimentar e gestão de riscos em sistemas de venda automática de alimentos e estudo associado aos hábitos alimentares*. Tese de Doutoramento. Instituto Universitário de Sanidad Alimentaria. Universidade de las Palmas de Gran Canaria.
- Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e Conselho de 29 de Abril de 2004. (2004). Relativo à higiene dos géneros alimentícios. *J. Of. da União Eur.* L139/1.
- Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão, de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *J.Of. da União Eur.* L322/12.
- Regulamento (CE) nº 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Outubro de 2004. (2004). Relativo aos materiais e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos. *J. Of. da União Eur.* L338/4.
- Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão de 15 Novembro de 2005. (2005). Relativo a critérios microbiológicos aplicados aos géneros alimentícios. *J. Of. da União Eur.* L338, 1–26.

- Richter, J. (1987). Ciprofloxacin treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 20(4):595–597. <https://doi.org/10.1093/jac/20.4.595>
- Rode, T. M., Langsrud, S., Holck, A., & Møretrø, T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 116(3):372–383.
- Rodrigues, D., Martinis, E. De, Teixeira, P., Gualtar, C. De, & Alegre, M. (2012). Biofilmes na indústria alimentar. In Azevedo NF, Cerca N (ed.), *Biofilmes - Na Saúde, No Ambiente, Na Indústria*, Porto, Cap.18, 173–187.
- Rosário, E. X. (2013). Desenvolvimento de um plano de controlo microbiológico da linha de doces. Dissertação de Mestrado em Sistemas de Prevenção e Controlo Alimentar. Escola Superior Agrária de Santarém. Instituto Politécnico De Santarém.
- Rossi, E., Scapin, D., & Tondo, E. (2013). Survival and transfer of microorganisms from kitchen sponges to surfaces of stainless steel and polyethylene. *J. Infect. Dev. Ctries.* 7: 229–234. <https://doi.org/10.3855/jidc.2472>
- Saidi, R., Mimoune, N., Baazizi, R., Benaissa, M. H., Khelef, D., & Kaidi, R. (2019). Antibiotic susceptibility of *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Algeria. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 6(2): 231–235. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f337>
- Sanlibaba, P., Tezel, B. U., & Senturk, E. (2018). Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Chicken in Turkey. *Korean J. Food Sci. of Animal Resources.* 38(2): 391–402. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.38.2.391>
- Santana, E. H. W. de, Beloti, V., Aragon-alegro, L. C., & Mendonça, M. B. O. C. de. (2010). *Estafilococos em Alimentos*. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo).* 77(3): 545–554. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v77p5452010>
- Santos, A. L. dos, Santos, D. O., Freitas, C. C. de, Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R., & Castro, H. C. (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 43, 413–423.
- Santos, S. F. C. (2011). The dual role of enterococci in food technology: bacteriocin production versus pathogenicity potential. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa.
- Saraiva, J., & Baptista, P. (2003). Higiene Pessoal na indústria alimentar. Forvisão–consultoria em formação integrada, Guimarães.

[http://www.esac.pt/noronha/manuais/manual\\_1\\_hig.pessoal.pdf](http://www.esac.pt/noronha/manuais/manual_1_hig.pessoal.pdf).

Saraiva, M., Correia, C. B., Cunha, I. C., Maia, C., Furtado, R., Bonito, C. C., & Calhau, M. A. (2019). Interpretação dos resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de produção e distribuição alimentar: valores-guia.

Scharlau. (2013a). Scharlau Microbiology - Technical data sheet Slanetz Bartley Agar. <https://www.scharlab.com/catalogo-productos-detalle-referencia.php?r=01-579-500&dw=Slanetz-Bartley-Agar-Base>

Scharlau. (2013b). Scharlau Microbiology - Technical data sheet Tryptone Bile Glucuronic Agar. <https://www.scharlab.com/catalogo-productos-detalle-referencia.php?r=01-619-500&dw=TBX-Agar>

Scharlau. (2017). Scharlau Microbiology - Technical data sheet Agar Selectivo *Bacillus cereus* 4–5. <https://www.scharlab.com/catalogo-productos-detalle-referencia.php?r=01-487-500&dw=Bacillus-cereus-Selectivo-Agar-PEMBA-#infotec>

Scharlau. (2020). Scharlau Microbiology - Technical data sheet Mannitol Salt Agar <https://www.scharlab.com/catalogo-productos-detalle-referencia.php?r=01-116-005&dw=Manitol-Hipersalino-Agar-Chapman-Agar->

Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M. F., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R., & Barreto Crespo, M. T. (2003b). Comparative study using type strains and clinical and food Isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 41(6): 2569 LP – 2576. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2569-2576.2003>

Semedo, T., Santos, M. A., Lopes, M. F., Marques, J. J. F., Crespo, M. T., & Tenreiro, R. (2003a). Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus. *Syst. Appl. Microbiol.* 26(1): 13–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1078/072320203322337263>

Silliker, J. H., & Gabis, D. A. (1976). ICMSF methods studies. VII. Indicator tests as substitutes for direct testing of dried foods and feeds for *Salmonella*. *Can. J. Microbiol.* 22(7):971–974. <https://doi.org/10.1139/m76-141>

Silva, M. S. (2013). Comparação de Métodos Analíticos de Referência: Determinação da Humidade do Leite em Pó. Dissertação de Mestrado em Gestão da Qualidade

e Segurança Alimentar. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar. Instituto Politécnico de Leiria.

- Soares, R. O., Fedi, A. C., Reiter, K. C., Caierão, J., & d'Azevedo, P. A. (2014). Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* 5(5): 634–637. <https://doi.org/10.4161/viru.28998>
- Spencer, J. F. T. (2004). *Environmental microbiology: Methods and Protocols*. 1ª Ed. Vol. 16 of *Methods in Biotechnology*. John F. T. Spencer, Alica L. Ragout de Spencer. Humana Press. 426.
- Stehling, E. G., Leite, D. S., & Silveira, W. D. (2010). Molecular typing and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Brazil. *Brazilian J. Infect. Dis.* 14(5):462–467.
- Stepanović, S., Vukovic, D., Holá, V., Bonaventura, G., Djukić, S., Cirković, I., & ruzička, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.* 115: 891–899. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
- Stewart, P. S., & William Costerton, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276), 135–138. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56(1): 187–209.
- Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9(5): 222–227.
- Tan, E., Mohammed, A., & Soon, J. M. (2016). Identification of *Escherichia coli* strains from water vending machines of Kelantan, Malaysia using 16S rRNA gene sequence analysis. *Water Qual. Expo. Heal.* 8. <https://doi.org/10.1007/s12403-016-0194-x>
- Teixeira, P., & Rodrigues, D. (2015). Adesão a superfícies de contacto com alimentos. *Bol. Biotecnol. Série* 2(6): 31–34.
- Teuber, M. (1999). Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell. Mol.*

- Life Sci. C. 56(9): 755–763. <https://doi.org/10.1007/s000180050022>
- Tortorello, M. L. (2003). Indicator organisms for safety and quality-uses and methods for detection: Minireview. J. AOAC Int. 86(6): 1208–1217. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.6.1208>
- Uckay, I., Pittet, D., Vaudaux, P., Sax, H., Lew, D., & Waldvogel, F. (2009). Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. Ann. Med. 41(2):109–119.
- [USDA] United States Department of Agriculture (2013). Molds on Food: Are They Dangerous? 1–5. [Acessado em 4 de Outubro de 2020] [https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/a87cdc2c-6ddd-49f0-bd1f-393086742e68/Molds\\_on\\_Food.pdf?MOD=AJPERES](https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/a87cdc2c-6ddd-49f0-bd1f-393086742e68/Molds_on_Food.pdf?MOD=AJPERES)
- [USDEC] United States Dairy Export Council. Shelf life and Packaging. Dairy for Global Nutrition. [Acessado 13 de Outubro de 2020 ], de <https://www.dairyglobalnutrition.org/safety-and-quality/shelf-life-and-packaging>
- Valerie, T., Michael E., S., Philip B., M., Herbert, A. , & Koch, B. (2001). Yeasts, molds and micotoxins. Em R. A. (Ed.), Bacteriological Analytical Manual (8<sup>a</sup>).
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Amorena, B., Penadés, J., & Lasa, I. (2003). SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 48: 1075–1087. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03493.x>
- Van der Mei, H. C., Buijssen, K. J. D. A., van der Laan, B. F. A. M., Ovchinnikova, E., Geertsema-Doornbusch, G. I., Atema-Smit, J., van de Belt-Gritter, B., & Busscher, H. J. (2014). Voice prosthetic biofilm formation and Candida morphogenic conversions in absence and presence of different bacterial strains and species on silicone-rubber. PloS One, 9(8), e104508–e104508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104508>
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. J. Appl. Microbiol. 109(4): 1117–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x>
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: microbial cities of scientific significance. J. Microbiol. Exp. 1(3) 84–98. <https://doi.org/DOI: 10.15406/jmen.2014.01.00014>.
- Viegas, S. J. (2010). Alterações do Estado de Saúde Associadas à Alimentação -

Contaminação Microbiológica de Alimentos. Em Instituto Nacional de Saúde  
Doutor Ricardo Jorge (INSA) (p. 42).

Wang, X., Li, G., Xia, X., Yang, B., Xi, M., & Meng, J. (2014). Antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail foods in Shaanxi, China. *Foodborne Pathog. Dis.* 11(4):281–286.

Willey, J. M., Sherwood, L., Prescott, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology (7<sup>a</sup>)*. McGraw-Hill Higher Education.  
<https://books.google.pt/books?id=qJVwQgAACAAJ>

Wingender, J., & Flemming, H.-C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 214(6): 417–423.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>

Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., & Zara, S. (2020). Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36(9): 134.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02911-5>

Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, J.-C., & Plesiat, P. (1999). In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(2): 287–291.

Zottola, E. A., & Sasahara, K. C. (1994). Microbial biofilms in the food processing industry—Should they be a concern? *Int. J. Food Microbiol.* 23(2): 125–148.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90047-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90047-7)



# ANEXOS

## Anexo I

**Tabela 9- Máquinas, características e valores médios de temperatura e humidade relativa.**

<b>Máquinas</b>	<b>Modelo</b>	<b>Bidão</b>	<b>Rota</b>	<b>Reposição leite (6 meses)</b>	<b>Temperatura °C (média 24h)</b>	<b>Humidade% (média 24h)</b>
1	Lei 700	Sim	6	90	23,5	53,1
2	Lei 500	Sim	22	3	21,2	56,2
3	Cristalo 400	Sim	18	1	24,4	52,1
4	Kikko RY	Sim	24	4	19,6	57,1
5	Kikko Max	Não	1	23	23,3	54,7
6	Concerto	Não	3	7	24,1	54,8
7	Concerto	Sim	3	9	21,4	51,7
8	Kikko Max	Sim	4	58	24,6	57,1
9	Brio up	Não	11	22	28,6	50,2
10	Lei 700	Sim	1	11	21,3	60,3
11	Lei 700	Não	14	11	27,5	54,2
12	Brio up	Sim	14	6	29,3	43,7
13	Winning	Sim	11	12	28,4	51,7
14	Combi	Sim	11	3	25,4	61,2
15	Concerto	Sim	11	1	21,2	54,1
16	Fas 500T	Sim	11	21	25,3	51,4
17	Kikko Max	Sim	2	11	23,5	54,1
18	Combi	Sim	23	17	26,15	40,2
19	Kikko Max	Sim	20	14	21,24	59,5

## **Anexo II**

### **Regras de Abastecimento-Limpeza e desinfecção**

- Verificar se a máquina está em serviço
- Verificar a existência de produtos do abastecimento anterior
- Iniciar a realização da coleta com o auxílio do PDA,
- Realizar a limpeza da base dos copos
- Realizar o abastecimento de copos, colheres e açúcar,
- Realizar o abastecimento do café,
- Retirar os depósitos dos restantes produtos sem os colocar no chão,
- Realizar o abastecimento dos solúveis
- Realizar a limpeza da base onde são colocados os depósitos dos produtos,
- Colocar os depósitos e limpar externamente,
- Realizar a limpeza do grupo de café (caneco do café, local onde entra a dose do café), com auxílio de pincel seco.
- Verificar se os bicos de fornecimento de produtos secos estão entupidos,
- Realizar limpeza a misturadores, calhas de depósitos de pó, condutas das bebidas, bicos de fornecimento das infusões e rampa do açúcar,
- Retirar o braço dos copos ou a rampa dos copos e realizar a sua limpeza com água quente,
- Realizar a lavagem da máquina,
- Realizar a limpeza dos bicos de saída de produtos (os finais, que se encontram juntos),
- Colocar o braço dos copos e limpar o bico de saída do açúcar e a saída das colheres (descida dos copos e colheres),
- Retirar grelha de saída dos produtos e realizar limpeza,
- Retirar e limpar bacia dos resíduos líquidos (caso exista),
- Realizar a restante limpeza do interior da máquina (balde, o fundo da máquina e as paredes interiores),
- Retirar o saco das borras de café e respetivo copo,
- Limpar o copo das borras de café,
- Retirar, despejar e limpar o balde dos resíduos,
- Colocar novo saco para as borras,
- Colocar pastilha com algum resto de água no balde de resíduos,
- Realizar a limpeza do interior da porta,
- Realizar uma lavagem automática da máquina,
- Realizar o registo da limpeza no PDA (Personal Digital Assistant),

- Realizar o registo de produtos colocados no PDA,
- Retirar a caixa do dinheiro,
- Fechar a máquina,
- Realizar um teste ao funcionamento da máquina (no mínimo com moeda de 0.50€ e a um café ou cappuccino),
- Realizar a limpeza ao exterior da máquina (no mínimo painel de botões e exterior da porta) e ao chão é frente da máquina.

Deve ainda realizar a coleta e extração do dinheiro da máquina sempre depois do abastecimento efetuado e antes de proceder ao carregamento é necessário verificar que os produtos que eventualmente ainda se encontram na máquina estão dentro da validade. Parâmetros como cheiro, cor são importantes na avaliação por parte dos operadores

### Anexo III

**Tabela 10 - Plano de higienização da empresa de *vending*.**

Área	Superfície / Equipamento	Atividade	Produto /Diluição	Responsável	Frequência	Registo
Armazém de Produtos	Câmara frigorífica - chão - geral	Prepare um pulverizador com o produto Varrer toda a área Pulverize a solução e deixe atuar uns minutos Enxague muito bem. As aplicações podem ser feitas normalmente, aplicando a solução com uma esfregona ou trapo para recuperar a solução saturada (para a aplicação no chão)	D10	Responsável da Limpeza	Diária	AS.100 - Registo de Limpeza – Armazém Ou fornecedor
	Pavimento	Varrer toda a área do armazém com auxílio do equipamento de limpeza	-----	Responsável da Limpeza Responsável de armazém	Diária	AS.100 - Registo de Limpeza – Armazém Ou fornecedor
Preparar uma solução com água Proceder à lavagem da superfície com o auxílio da máquina de limpeza		Actival F4r	Semanal			
Viaturas Caixas/Arca	Paredes Teto Pavimentos	Prepare uma solução com o produto Pulverize a solução Deixe atuar uns minutos Proceder à lavagem da superfície com o auxílio de uma esponja e limpeza Enxaguar muito bem e secar com um pano ou papel	CIFcreme D10	Abastecedor	Diário	----
Viaturas	Interior	Prepare uma solução com o produto Varrer/aspirar toda a área Pulverize a solução e deixe atuar uns minutos Proceder à lavagem da superfície com o auxílio de uma esponja e limpeza Enxaguar A limpeza exterior da viatura é realizada fora da empresa.	CIF creme D10	Abastecedor	Diário	----
	Exterior	De acordo com metodologia da empresa de limpeza	----	Abastecedor	Quinzenal	AS.067 - Plano de Limpeza de viaturas

Área	Superfície / Equipamento	Atividade	Produto /Diluição	Responsável	Frequência	Registo
Arcas Transporte	Interior (paredes e tampa) Exterior	Prepare uma solução com o produto Enxaguar Pulverize a solução e deixe atuar uns minutos Proceder à lavagem da superfície com o auxílio de uma esponja e limpeza Enxaguar muito bem e secar com um pano ou papel	CIF creme D10	Abastecedor	Diário	----
Máquinas	Interior Exterior	De acordo com as regras de abastecimento e ficha de higienização	D10	Abastecedor	Diária	AS.100 - Registo de Limpeza – Máquinas Registo programa Vega
Escritórios	Pavimento Caixotes do Lixo	Prepare uma solução com o produto Proceder à lavagem da superfície com o auxílio de uma esponja/esfregona Enxaguar muito bem.	Lava tudo Lixívia	Responsável da Limpeza	Diária	AS.100 - Registo de Limpeza - Escritório
	Paredes e Teto		Lava tudo ou equivalente		4 em 4 meses	
	Vidros	Preparar a solução num pulverizador. Pulverize o produto sobre a superfície. Deixe atuar uns minutos. Enxaguar muito bem.	Limpa Vidros		Mensal	
Oficina manutenção	Pavimento Bancadas Lavatório Caixotes do Lixo	Prepare uma solução com o produto Proceder à lavagem da superfície com o auxílio de uma esponja/esfregona Limpeza Enxaguar muito bem.	Lava tudo ou equivalente Lixívia	Responsável da Limpeza	Diária	AS.100 - Registo de Limpeza - Oficina
	Paredes e Teto		Lava tudo ou equivalente		4 em 4 meses	
Casas de Banho e balneários	Pavimento Sanitas/Urinois Lavatórios/Espelhos Caixotes do Lixo	Prepare uma solução com o produto Proceder à lavagem da superfície com o auxílio de uma esponja/esfregona Limpeza	Lixívia CIF creme	Responsável da Limpeza	Diária	AS.100 - Registo de Limpeza –

Área	Superfície / Equipamento	Atividade	Produto /Diluição	Responsável	Frequência	Registo
	Paredes e Teto	Enxaguar muito bem.	Lava tudo ou equivalente		4 em 4 meses	Casa de Banho
	Vidro	Preparar a solução num pulverizador. Pulverize o produto sobre a superfície. Deixe atuar uns minutos. Enxague muito bem	Limpa Vidros		Mensal	
Bidões	Interior	Prepare uma solução com o produto Enxaguar e deixe atuar uns minutos Proceder à lavagem, agitando o produto no interior Enxaguar muito bem e secar	D10	Responsável da Limpeza	Semanal Ou a cada troca na máquina	----
	Exterior	Prepare uma solução com o produto Enxaguar Pulverize a solução e deixe atuar uns minutos Proceder à lavagem da superfície com o auxílio de uma esponja e limpeza Enxaguar muito bem e secar com um pano ou papel	D10	Responsável da Limpeza	Semanal Ou a cada troca na máquina	----
Tubagens	Interior	Prepare uma solução com o produto Enxaguar fazendo passar a solução pelo interior com auxílio da bomba. Enxaguar muito bem fazendo passar água pelo interior com auxílio da bomba.	D10	Técnico de Manutenção	Anual	Registo de manutenção
Cestos/ tabuleiros	Interior e Exterior	Proceder à lavagem da superfície com o auxílio da máquina de limpeza	Água quente/D10	Abastecedor	Diária	----

## Anexo IV

**Tabela 11 - Valores guia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para microrganismos indicadores de higiene e de alteração pertencentes ao sub-grupo1A.**

Microrganismos	Resultado contagem (UFC/g ou UFC/ml) ou pesquisa (em 25g)		
	Satisfatório	Questionável	Não satisfatório
<i>E.coli</i>	<10(Não detetado)	Não aplicável	≥10
Bolores	<5*10 <sup>2</sup>	5*10 <sup>2</sup> -≤10 <sup>3</sup>	>10 <sup>3</sup>
Leveduras	<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> - ≤10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>

**Tabela 12 - Valores guia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para superfícies de contato referentes à zona 1.**

Tipos de superfícies	Fase em que se aplica	Microrganismos a 30°C	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i> / Estafilococos coagulase +
Contactam com o alimento pronto para consumo ou matéria-prima	Prontas a utilizar (expostas ou guardadas)	≤10 <sup>2</sup> UFC/peça ou ≤10 <sup>2</sup> UFC/100 cm <sup>2</sup> ou ≤1 UFC/ml de capacidade da peça	<10 UFC/peça ou <10 UFC/100 cm <sup>2</sup> (inferior ao limite de deteção)	<10 UFC/peça ou <10 UFC/100 cm <sup>2</sup> (inferior ao limite de deteção)



## Anexo V

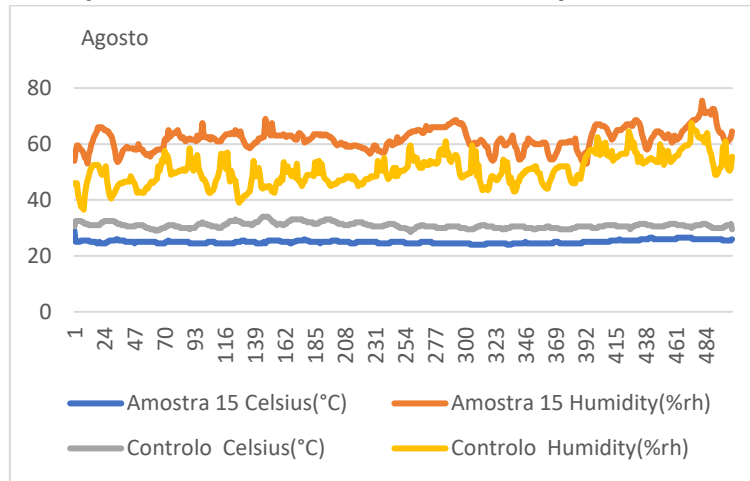
Tabela 13 - Critérios microbiológicos para a categoria de leite em pó.

Microrganismos	Plano amostragem		Limites		Método análise de referência	Fase em que se aplica
	n	C	n	m		
<i>Salmonella</i>	5	0	Não detetado em 25g		ISO 6579-1	colocados no mercado durante vida útil
<i>Estafilococos coagulase +</i>	5	2			ISO19020	colocados no mercado durante vida útil
<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0	10UFC/g		ISO21528-2	Fim do processo

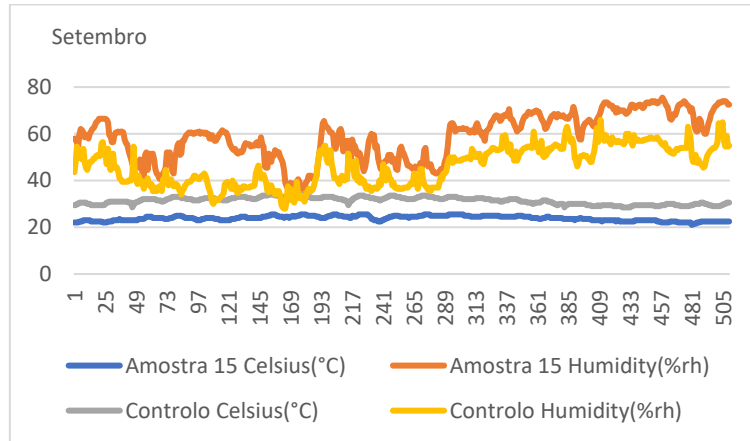
Legenda: n=número de unidades que constituem a amostra; c=número de unidades de amostra com valores entre m e M.

## Anexo VI

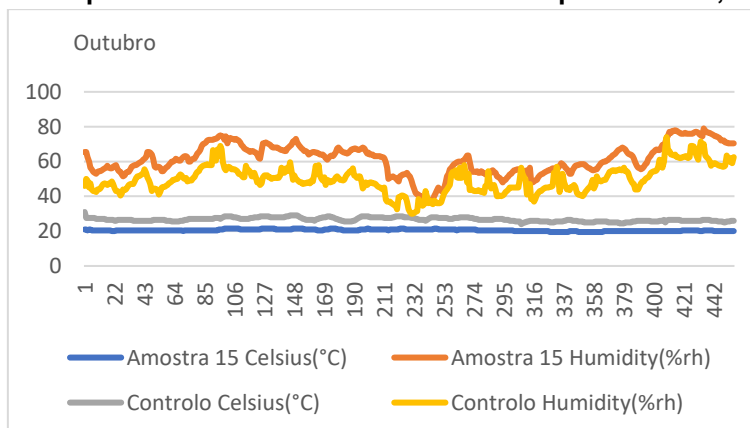
**Figura 8 - Temperatura e humidade relativa das máquinas 2 e 15, em Agosto**



**Figura 9 - Temperatura e humidade relativa das máquinas 2 e 15, em Setembro**



**Figura 10 - Temperatura e humidade relativa das máquinas 2 e 15, em Outubro**



## Anexo VII

**Tabela 14 - Classificação e análise estatística dos isolados relativamente à capacidade de formação de biofilme.**

Isolados	Valor da média de absorvância dos isolados(nm)			Valor da média de observância do controlo negativo (nm)			Análise estatística	Classificação (produtor biofilme)
	24h	48h	72h	24h	48h	72h		
<b>E1</b>	0,0075	0,0002	0,0009	0,1421	0,1272	0,1402	P>0.05 Não há diferença significativa 0,639	Não produtor (0,0,0)
<b>E22</b>	0,2038	0,2025	0,2400	0,1421	0,1272	0,1402	1	Fraco (1,1,1)
<b>E60</b>	0,1824	0,1476	0,1900	0,1421	0,1272	0,1402	1	Fraco (1,1,1)
<b>S41</b>	0,0827	0,1121	0,2932	0,2118	0,2169	0,2226	1	Fraco (0,0,1)
<b>S43</b>	0,0594	0,0597	0,0679	0,2118	0,2169	0,2226	0,174	Não produtor (0,0,0)
<b>S50</b>	0,0592	0,0462	0,0602	0,2118	0,2169	0,2226	0,109	Não produtor (0,0,0)
<b>1PT</b>	0,2727	0,3247	0,2899	0,1421	0,1272	0,1402	0,001	Médio (1,2,2)
<b>2P</b>	1,0683	1,1839	1,0384	0,2118	0,2169	0,2226	0	Forte (3,3,3)
<b>3PF</b>	0,3441	0,5196	0,5651	0,2118	0,2169	0,2226	0	Médio (1,2,2)
<b>21P</b>	1,0496	1,0692	0,7241	0,2118	0,2169	0,2226	0	Forte (3,3,2)
<b>40P</b>	0,0560	0,0644	0,0594	0,2118	0,2169	0,2226	0,149	Não produtor (0,0,0)
<b>C+</b>	0,3063	0,8910	0,5295	0,2118	0,2169	0,2226	0	Médio (1,3,2)

Legenda: Para a classificação: não produtor biofilme (0)  $DO \leq DO$  controlo negativo ( $DO_{cn}$ ); Fraco produtor de biofilme (1)  $DO_{cn} < DO \leq 2DO_{cn}$ ; Médio produtor de biofilme (2)  $2DO_{cn} < DO \leq 4DO_{cn}$ ; Forte produtor de biofilme (3)  $\geq 4DO_{cn}$ .

## Anexo VIII

Tabela15 – Limites de suscetibilidade para antibióticos (diâmetro do halo), de acordo com os sistemas de classificação CLSI e EUCAST.

Antibiótico/dose	CLSI (mm)		EUCAST (mm)		Gêneros
	S	R	S	R	
<b>Aztreonam 30</b>	≥22	≤15	≥18	≤18	
<b>Cefatzidime 30</b>	≥18	≤14	1	1	<i>Pseudomonas</i> spp.
<b>Gentamicina 10</b>	≥15	≤12	≥15	≤15	
<b>Imipenem 10</b>	≥19	≤15	≥20	≤20	
<b>Ciprofloxacina 5</b>	≥21	≤15	≥21	<21	
<b>Clindamicina 2</b>	≥21	≤14	≥22	<19	<i>Staphylococcus</i> spp.
<b>Gentamicina 10</b>	≥15	≤12	≥18	<18	
<b>Rifampicina 5</b>	≥20	≤16	≥26	<23	
<b>Trimetroprima-sulfametoxazol 25</b>	≥16	≤10	≥17	<14	
<b>Cloranfenicol 30</b>	≥18	≤12	*	*	
<b>Estreptomicina 300</b>	≥10	≤6	≥14	<14	<i>Enterococcus</i> spp.
<b>Gentamicina 120</b>	≥10	≤6	≥8	<8	
<b>Quinupristina dalfopristina 5</b>	≥21	≤15	≥22	<20	
<b>Vancomicina 30</b>	≥17	≤14	≥12	<12	

Legenda: CLSI/EUCAST- versão 2019 (R-resistente, I-intermédio, S-sensível, \* *Breakpoint* não estabelecido, 1 Dose diferente);