



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Implementação e validação de métodos de análises microbiológicas em águas de consumo humano**

**Ana Margarida Martins Carriço Proença**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Química Industrial**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Albertina Maria Mendes Marques Bento Amaro  
Coorientadora: Mestre Joana Alexandra Rodrigues Trindade

**Covilhã, junho de 2014**

## Agradecimentos

É meu desejo agradecer a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, e que direta ou indirectamente me ajudaram a concluir este desafio.

À minha orientadora, Professora Doutora Albertina Marques , que desde o primeiro contacto que estabelecemos se manifestou interessada em orientar este trabalho, muito obrigado. Obrigado pela sua disponibilidade, motivação, estímulo, apoio, ensinamentos e cuidadosa revisão científica do texto.

À Mestre Joana Trindade, por todo o interesse, ajuda prestada ao longo da realização do trabalho laboratorial e escrito, incentivo, paciência, conhecimentos transmitidos, sugestões e críticas. Agradeço também pelo companheirismo e por todos os momentos passados, dentro e fora do laboratório. Sei que ganhei uma grande amiga para a vida. Sem a sua valiosíssima orientação, a conclusão deste trabalho não teria sido possível.

Às técnicas do laboratório, Laurinda e Célia, pelos ensinamentos, pela paciência, boa disposição e ajuda que sempre me dedicaram.

Ao meu marido, obrigado pela imensa compreensão, por toda a colaboração e pelo incentivo que me deu nos momentos mais difíceis. Obrigado por todo o amor, amizade e companheirismo.

Às minhas queridas filhas, agradeço por todo o amor, carinho e compreensão e peço desculpa por todos os fins-de-semana, férias e tempos livres que não pudemos partilhar nem gozar! Mas que prometo recompensar.

## Resumo

A água é um dos bens e mais escassos que a humanidade possui. O acesso a água potável e de qualidade é uma necessidade primária e portanto um direito fundamental. As diretivas europeias e a legislação nacional encontram-se direcionadas para garantir que a água de consumo humano seja salubre e limpa, eliminando ou reduzindo a concentração de contaminantes microbiológicos e/ou físico-químicos que poderiam afetar a saúde humana.

As entidades gestoras devem ter um programa de controlo e qualidade da água (PCQA). O PCQA é um plano anual de controlo e monitorização da água distribuída para consumo humano, previsto pelo Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto.

Os laboratórios que queiram realizar análises de controlo de qualidade devem ser acreditados para os diferentes parâmetros.

A acreditação obriga à validação do método. Validar um método é realizar um conjunto de procedimentos e técnicas de forma a comprovar que o método serve para o fim previsto. Todos os resultados devem ser registados, tratados estatisticamente e arquivados de forma a constituírem uma evidência documentada por forma a demonstrar que um processo conduz a resultados de qualidade consistentes e dentro das especificações predeterminadas. Recomenda-se, sempre que existam, a utilização de métodos normalizados ou de referência.

Neste trabalho realizou-se todo o processo de implementação e validação dos métodos de análise dos microrganismos requeridos no DL 306/2007 para controlo da qualidade da água de consumo humano. Para cada método foi demonstrado por meio de estudos que o método utilizado cumpre com o propósito para o qual foi desenvolvido e as características representativas dos mesmos cumprem com as especificações exigidas sendo por isso adequado a sua aplicação.

## Palavras chave

Acreditação de Laboratórios de Análise de Microbiologia; Métodos Normalizados; Análise Microbiológica; Validação e Implementação de Métodos Microbiológicos; Qualidade da Água de Consumo Humano.

## Abstract

Undoubtedly, the water is among the most valuable and scarce goods of mankind. The access to potable water is a primary requirement for everyone and - hence - it constitutes a fundamental right. The current European directives and National laws directly enforce that the water for human consumption is healthy and clean, reducing or even eliminating the amounts of microbiologic and / or chemical pollutants that might potentially affect the human health.

The management entities must conduct control procedures to assure the quality of water (PCQA). These PCQA plans are usually annual and monitor the water quality for human consumption, being predicted by the ordinance-law n. 306/2007, of August, 27th.

In this scope, any laboratory that wishes to conduct analysis to control water quality must be accredited for all the different parameters devised in that law. This accreditation turns mandatory the previous validation of the methods used in the control procedures. Here, validate consists in a set of procedures and techniques that should assure that the whole methodology is suitable for its final goal. All the results must be recorded and statistically analysed, in order to provide a documental evidence and to demonstrate that the process leads to consistent quality results that accord the predefined specifications. Due to these points, it is recommended to use, whenever possible, normalised and well known methods.

In this work, we performed the whole process of implementation and validation of the methods for microbiologic analysis required by the above referred ordinance-law 306/2007, in order to control the water quality for human consumption. We demonstrate that each method fits the purposes that led to its development and also confirm that its main features accord the required specifications, turning adequate its application in real scenarios.

## Keywords

Accreditation of Laboratories for Microbiological Analysis; Normalised Methods, Microbiological Analysis; Validation and Implementation of Microbiological Methods; Water Quality for Human Consumption.

## Índice

<b>Capítulo 1 – Introdução</b> .....	1
1.1. Objetivos do trabalho .....	4
1.2. Estrutura da dissertação .....	4
<b>Capítulo 2 - Fundamentos teóricos</b> .....	6
2.1. A Água .....	7
2.2. Caracterização das bactérias em estudo .....	8
2.2.1. Bactérias Coliformes .....	8
2.2.2. <i>Escherichia Coli</i> .....	8
2.2.3. Número de colónias a 22 °C e a 37 °C .....	9
2.2.4. <i>Clostridium perfringens</i> .....	10
2.2.5. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	10
2.3. Decreto-lei nº 306/2007, de 27 de agosto .....	11
2.4. Nutrição e crescimento de microrganismos .....	12
2.4.1. Cinética do crescimento em descontínuo .....	13
2.4.2. Curva de crescimento .....	15
2.4.3. Fatores que afetam o crescimento microbiano .....	17
2.4.4. Meios de cultura .....	22
<b>Capítulo 3 - Fundamentos práticos</b> .....	23
3.1. A Labinter .....	24
3.2. Acreditação e validação de métodos de ensaio .....	26
3.3. Garantia da qualidade dos resultados / controlo da qualidade do desempenho .....	28
3.3.1. Controlo da qualidade interno .....	28
3.3.2. Controlo da qualidade externo .....	32
3.4. Amostragem .....	34
3.5. Métodos normalizados .....	37
3.5.1. Método para pesquisa e quantificação de <i>Enterococcus</i> – ISO 7899-2:2000 .....	37
3.5.2. Enumeração de microrganismos viáveis – número de colónias a 22 °C e 37 °C – ISO 6222:1999.....	38
3.5.3. Método para pesquisa e quantificação de <i>Clostridium perfringens</i> – EA – Parte 6 Método B, The Microbiology of Drinking Water (2010).....	38
3.6. Métodos não normalizados.....	42

3.6.1. Pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes e <i>Echerichia Coli</i> – Método de filtração por membrana .....	42
<b>Capítulo 4 - Resultados e discussão .....</b>	<b>46</b>
4.1. Validação e implementação dos métodos .....	47
4.1.1. Experiência do método .....	47
4.1.2. Carta de duplicados .....	54
4.1.3. Cálculo de incertezas .....	66
4.1.4. Cartas guia .....	72
4.2. Controlo de qualidade externo .....	85
<b>Capítulo 5 – Conclusões e perspectivas de trabalho futuro .....</b>	<b>86</b>
Bibliografia .....	90

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> - Estrutura da dissertação .....	4
<b>Figura 2</b> - Representação semilogarítmica do crescimento exponencial .....	14
<b>Figura 3</b> - Ciclo de crescimento microbiano .....	15
<b>Figura 4</b> - Variação da taxa específica de crescimento $\mu$ de um microrganismo com a concentração de um nutriente essencial (S) limitante do crescimento .....	18
<b>Figura 5</b> - Relação temperatura / taxa de crescimento de um microrganismo .....	19
<b>Figura 6</b> - Desinfecção da torneira .....	36
<b>Figura 7</b> - Colónias de <i>Enterococcus</i> características em meio de cultura Slanetz and Bartley .....	37
<b>Figura 8</b> - Colónias típicas de <i>Enterococcus</i> em meio de cultura BEA .....	38
<b>Figura 9</b> - Colónias típicas de <i>Clostridium perfringens</i> .....	39
<b>Figura 10</b> - Teste da motilidade .....	40
<b>Figura 11</b> - Teste de redução de nitrato a nitrito .....	41
<b>Figura 12</b> - Colónias amarela, colonias presumíveis de Bactérias Coliformes / <i>Escherichia coli</i> .....	43
<b>Figura 13</b> - Teste oxidase .....	43
<b>Figura 14</b> - Produção de Indol com adição do Reagente Kovac's .....	44
<b>Figura 15</b> - Amplitudes dos duplicados obtidos - Pesquisa e Quantificação de <i>Enterococcus</i> .....	55
<b>Figura 16</b> - Amplitudes dos duplicados obtidos - Microrganismos a 22 °C .....	57
<b>Figura 17</b> - Amplitudes dos duplicados obtidos - Microrganismos a 37 °C .....	59
<b>Figura 18</b> - Amplitudes dos duplicados obtidos - <i>Clostridium perfringens</i> .....	61
<b>Figura 19</b> - Amplitudes dos duplicados obtidos - Bactérias Coliformes .....	63
<b>Figura 20</b> - Amplitudes dos duplicados obtidos - <i>Escherichia coli</i> .....	65
<b>Figura 21</b> - Carta guia - <i>Enterococcus</i> .....	74
<b>Figura 22</b> - Carta guia - Microrganismos a 22 °C .....	76
<b>Figura 23</b> - Carta guia - Microrganismos a 37 °C .....	78
<b>Figura 24</b> - Carta guia - <i>Clostridium perfringens</i> .....	80
<b>Figura 25</b> - Carta guia - Bactérias Coliformes .....	82
<b>Figura 26</b> - Carta guia - <i>Escherichia coli</i> .....	84

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Valores paramétricos definidos no Decreto-lei N.º 306/2007 de 27 de Agosto para os parâmetros microbiológicos .....	12
<b>Tabela 2</b> - Tipos de Meios de cultura .....	22
<b>Tabela 3</b> - Ensaio realizados incluídos no âmbito da acreditação .....	25
<b>Tabela 4</b> - Ensaio realizados não incluídos no âmbito da acreditação .....	26
<b>Tabela 5</b> - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de <i>Enterococcus</i> .....	47
<b>Tabela 6</b> - Resultados obtidos para a experiência do método - Contagem de microrganismos a 22 °C .....	48
<b>Tabela 7</b> - Resultados obtidos para a experiência do método - Contagem de microrganismos a 37 °C .....	49
<b>Tabela 8</b> - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de <i>Clostridium perfringens</i> .....	50
<b>Tabela 9</b> - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de Bactérias Coliformes .....	51
<b>Tabela 10</b> - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de <i>Escherichia coli</i> .....	52
<b>Tabela 11</b> - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Pesquisa e Quantificação de <i>Enterococcus</i> .....	54
<b>Tabela 12</b> - Determinação da média das amplitudes e CP - <i>Enterococcus</i> .....	55
<b>Tabela 13</b> - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Contagem de Microrganismos a 22 °C .....	56
<b>Tabela 14</b> - Determinação da média das amplitudes e CP - Microrganismos a 22 °C .....	56
<b>Tabela 15</b> - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Contagem de Microrganismos a 37 °C .....	58
<b>Tabela 16</b> - Determinação da média das amplitudes e CP - Microrganismos a 37 °C .....	58
<b>Tabela 17</b> - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Pesquisa e Quantificação de <i>Clostridium perfringens</i> .....	60
<b>Tabela 18</b> - Determinação da média das amplitudes e CP - <i>Clostridium perfringens</i> ...	60
<b>Tabela 19</b> - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Pesquisa e Quantificação de Bactérias Coliformes .....	62
<b>Tabela 20</b> - Determinação da média das amplitudes e CP - Bactérias Coliformes .....	62
<b>Tabela 21</b> - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Pesquisa e Quantificação de <i>Escherichia coli</i> .....	64
<b>Tabela 22</b> - Determinação da média das amplitudes e CP - <i>Escherichia coli</i> .....	64
<b>Tabela 23</b> - Cálculo da variância - Pesquisa e Quantificação de <i>Enterococcus</i> .....	66
<b>Tabela 24</b> - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - <i>Enterococcus</i> .....	67

<b>Tabela 25</b> - Cálculo da variância - Contagem de Microrganismos a 22 °C .....	67
<b>Tabela 26</b> - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - Microrganismos a 22 °C ...	67
<b>Tabela 27</b> - Cálculo da variância - Contagem de Microrganismos a 37 °C .....	68
<b>Tabela 28</b> - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - Microrganismos a 37 °C ...	68
<b>Tabela 29</b> - Cálculo da variância - Pesquisa e Quantificação de <i>Clostridium perfringens</i> .....	69
<b>Tabela 30</b> - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - <i>Clostridium perfringens</i> ..	69
<b>Tabela 31</b> - Cálculo da variância - Pesquisa e Quantificação de Bactérias Coliformes ..	70
<b>Tabela 32</b> - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - Bactérias Coliformes .....	70
<b>Tabela 33</b> - Cálculo da variância - Pesquisa e Quantificação de <i>Escherichia coli</i> .....	71
<b>Tabela 34</b> - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - <i>Escherichia coli</i> .....	71
<b>Tabela 35</b> - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Pesquisa e Quantificação de <i>Enterococcus</i> .....	73
<b>Tabela 36</b> - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia - <i>Enterococcus</i> .....	74
<b>Tabela 37</b> - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Contagem de Microrganismos a 22 °C .....	75
<b>Tabela 38</b> - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia - Microrganismos a 22 °C .....	76
<b>Tabela 39</b> - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Contagem de Microrganismos a 37 °C .....	77
<b>Tabela 40</b> - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia - Microrganismos a 37 °C .....	78
<b>Tabela 41</b> - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Pesquisa e Quantificação de <i>Clostridium perfringens</i> .....	79
<b>Tabela 42</b> - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia - <i>Clostridium perfringens</i> .....	80
<b>Tabela 43</b> - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Pesquisa e Quantificação de Bactérias Coliformes .....	81
<b>Tabela 44</b> - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia - Bactérias Coliformes .....	82
<b>Tabela 45</b> - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Pesquisa e Quantificação de <i>Escherichia coli</i> .....	83
<b>Tabela 46</b> - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia - <i>Escherichia coli</i> .....	84

## Lista de Acrónimos

BEA	Bile – esculina - agar
CE	Comunidade Europeia
CIPM	Comité Internacional de Pesos e Medidas
CP	Critério de Precisão
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>E. Coli</i>	<i>Echerichia Coli</i>
EA	Environment Agency
EIC	Ensaio Interlaboratoriais
EN	European Committe for Standardization
ERSAR	Entidade Reguladora de Águas e Resíduos
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
HPE	Public Heault Englang
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IRAR	Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
ISO	International Organization for Standardization
LIA	Limite Inferior de Alarme
LIAV	Limite Inferior de Aviso
LSA	Limite Superior de Alarme
LSAv	Limite Superior de Aviso
MI	Método Interno
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
NP	Norma Portuguesa
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCQA	Programa de controlo da qualidade da água
RNA	Ácido Ribonucleico
TSA	Trypticase Soy Agar
ufc	Unidade Formadora de Colonias
VIM	Vocabulário Internacional de Medição

## **Capítulo 1 - Introdução**

## 1 - Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde, (OMS), todas as pessoas têm o direito a ter acesso a um suprimento adequado de água potável e segura.

As águas naturais contêm microrganismos que são consequência do contato da água com o solo e com o ar. Na sua maioria os microrganismos encontrados nas águas são inofensivos e o seu número e natureza variam, com o lugar e com as condições ambientais.

Ao longo do seu percurso, as águas naturais, superficiais ou subterrâneas, podem ser contaminadas com microrganismos patogénicos. Alguns destes organismos podem sobreviver longos períodos de tempo, em águas naturais, não necessitando do homem como hospedeiro, enquanto outros possuem uma capacidade de sobrevivência muito reduzida.

O crescimento da população a nível mundial e, o aumento do uso da água para diferentes atividades incrementaram os níveis de contaminação dos recursos hídricos existentes. Até finais do século XIX, a avaliação e o controlo de riscos para a saúde humana, por transmissão de doenças provocadas por consumo de água, eram realizadas de forma empírica, confiando-se primordialmente na aparência física da água [1].

Águas não tratadas podem transmitir doenças tais como cólera, hepatite infecciosa, esquistossomose, febre-amarela, malária, entre outras. Por este motivo, no início do século XX, e após vários surtos epidémicos de cólera e febre tifóide na Europa, desenvolveram-se meios técnicos e legais para a desinfeção da água em sistemas públicos de abastecimento [1]. O tratamento da água inclui o processo de desinfeção que tem como objetivo a destruição ou inativação de organismos patogénicos, capazes de produzir doenças. A escolha de um método de desinfeção apropriado deve ser adaptado aos requisitos locais, com o objetivo de alcançar a maior segurança microbiológica e o menor risco de subprodutos de desinfeção indesejáveis.

A qualidade da água, até meados do século XX, foi avaliada essencialmente através das suas propriedades organolépticas, onde imperava o senso comum, ou seja, exigia-se que ela se apresentasse límpida, agradável ao paladar e sem cheiro desagradável. No entanto, este tipo de avaliação demonstrou limitações, em termos de protecção de saúde pública, contra microrganismos patogénicos e contra substâncias químicas perigosas presentes na água. Deste modo, tornou-se necessário o estabelecimento de valores paramétricos, que correspondessem de forma clara e objetiva às características a que uma água de consumo humano deveria obedecer [1].

O controlo da qualidade das águas de consumo humano, através da análise frequente, em diferentes pontos de colheita é importante e necessário para a segurança da população. Um

controlo de qualidade eficiente aumenta o nível de confiança, por parte dos consumidores na qualidade do serviço que lhes é prestado. O fornecimento de água de consumo humano é um conjunto de ações concertadas e estruturadas, ao longo de toda a rede de abastecimento, desde a sua origem bruta até à torneira do consumidor [1].

As análises da água de consumo humano são obrigatórias por lei e, deverão ser realizadas por laboratórios acreditados e reconhecidos, pela entidade reguladora competente (ERSAR).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos, para as operações analíticas pretendidas.

O laboratório, ao utilizar métodos de ensaios emitidos por organismos de normalização, organizações reconhecidas na sua área de atuação, ou publicados em livros e/ou periódicos de grande credibilidade na comunidade científica, necessita demonstrar que tem condições de operar, de maneira adequada, estes métodos normalizados, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implantá-los.

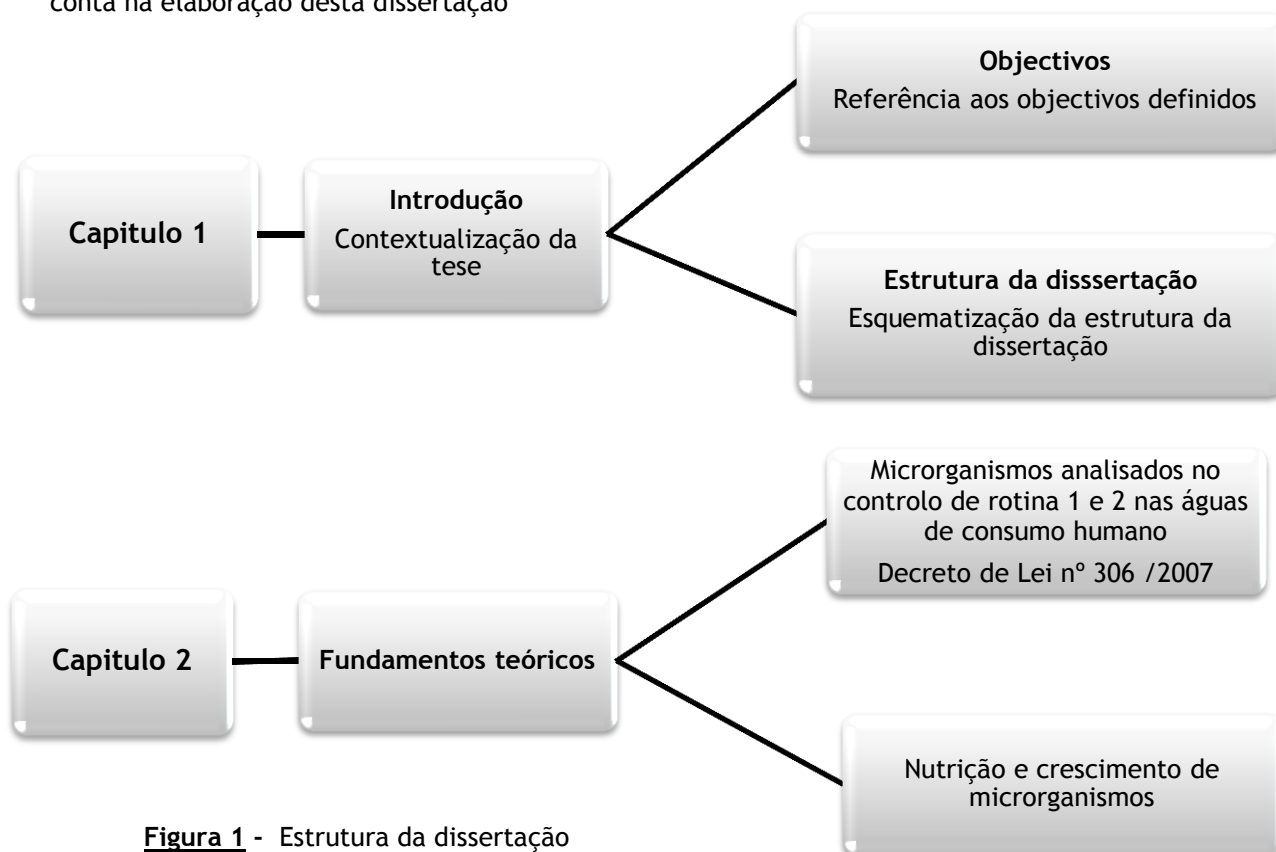
## 1.1. Objectivos

O presente trabalho foi realizado no âmbito da obtenção do grau de mestre, em Química Industrial. Toda a parte experimental foi realizada no laboratório de microbiologia alimentar da empresa Labinter. Teve como principais objectivos:

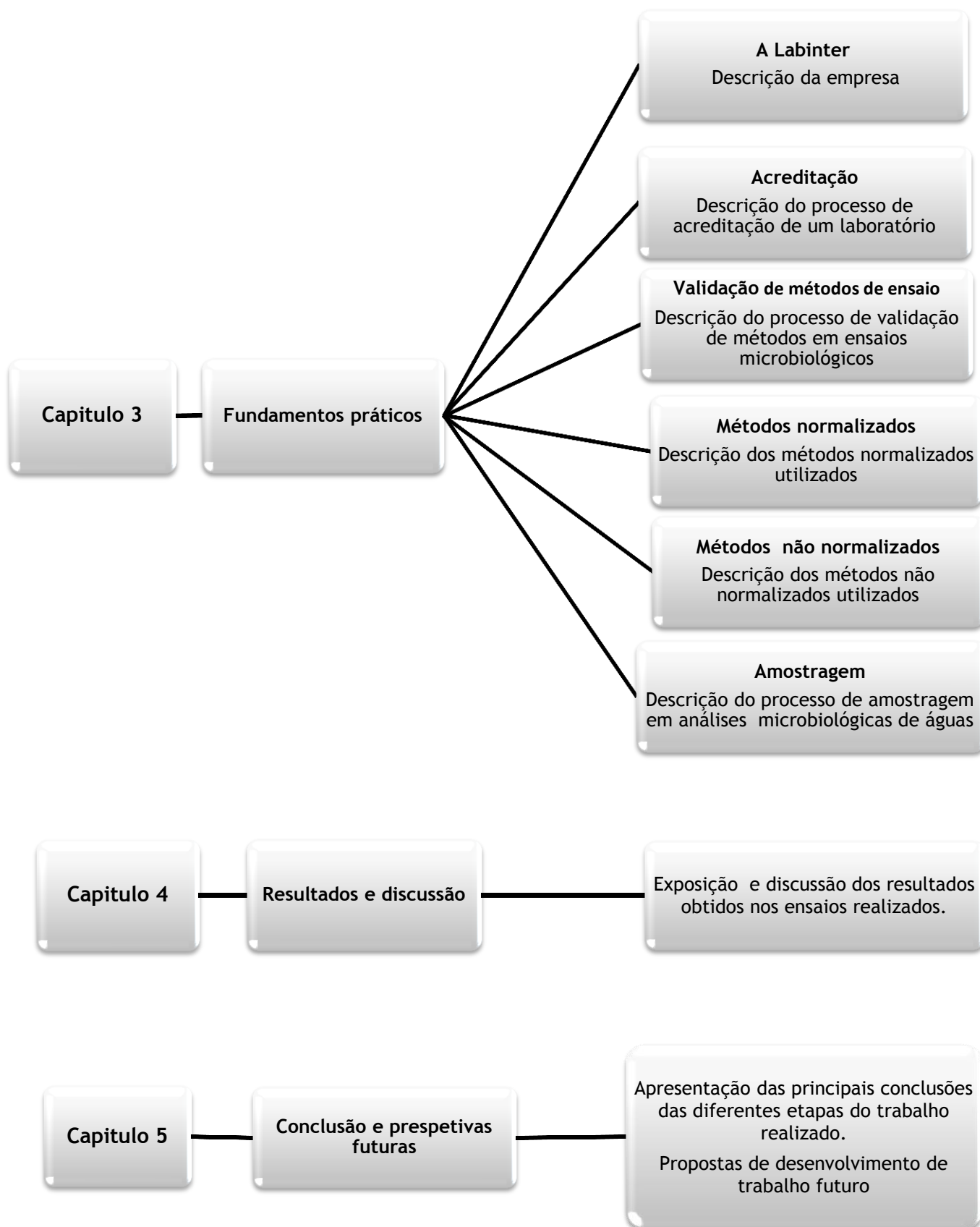
- Identificar aspetos microbiológicos da qualidade da água, destinada ao consumo humano;
- Compreender os fundamentos e a importância do recurso à pesquisa de bactérias indicadoras de contaminação fecal, na análise por rotina da qualidade de uma água;
- Compreender a metodologia envolvida na pesquisa e enumeração de bactérias indicadoras de contaminação fecal na água, destinada ao consumo humano;
- Validar e implementar métodos de análises microbiológicas em águas de consumo humano;
- Obter experiência na prática de análises microbiológicas de rotina, realizadas em águas de consumo humano.

## 1.2. Estrutura da dissertação

De uma forma esquemática podem considerar-se os seguintes aspectos que foram tidos em conta na elaboração desta dissertação



**Figura 1** - Estrutura da dissertação



**Figura 1** - Estrutura da dissertação (Continuação)

## **Capítulo 2 - Fundamentos teóricos**

## Capítulo 2 - Fundamentos teóricos

### 2.1. A água

A água constitui um elemento indispensável à vida, não só na cobertura das necessidades hídricas do indivíduo, mas também por ser utilizada em muitas outras actividades, igualmente indispensáveis à qualidade de vida do homem, tais como: a preparação e cozedura de alimentos, a lavagem e evacuação das matérias fecais, etc. Constitui, por isso, um factor essencial do saneamento básico, da higiene pública e individual e da melhoria global [2-5].

A ingestão de organismos patogénicos, devida à contaminação hídrica, representa um risco para a saúde de homens e animais. Por este motivo, em 1958, surge a primeira publicação da Organização Mundial de Saúde, (OMS) dedicada especificamente à qualidade da água de consumo humano, sob o título “*International Standards for Drinking-Water*” [1,4,5].

Assim, as normativas em vigor estabelecem o regime da qualidade da água, destinada ao consumo humano, tendo por objetivo proteger a saúde destes dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água e assegurar a disponibilização de água salubre, limpa e desejavelmente equilibrada na sua composição, desde a estação de tratamento de água (ETA) até às torneiras dos consumidores.

Uma grande variedade de doenças podem ser devidas à presença de vírus, bactérias e protozoários, veiculados pelas águas ou alimentos contaminados com matérias fecais. São utilizados organismos indicadores de qualidade da água, como um índice da possível contaminação da água com organismos patogénicos humanos [2,4-6].

As bactérias indicadoras de contaminação fecal, que residem no intestino humano ou animal, são usadas em todo o mundo, para avaliar a qualidade microbiológica das águas de consumo humano. O grupo de bactérias usadas como indicadores de poluição fecal, são as bactérias coliformes, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e os *Enterococcus faecalis* [3,6,7].

A noção de qualidade da água tem, no que diz respeito ao ambiente em geral, e à água em particular, um sentido que deve ser definido com o rigor possível [2].

O conceito de qualidade da água é relativo, uma vez que a sua caracterização, é função do seu utilizador ou do fim a que se destina. Nenhuma água é boa para todos os fins [2].

Em Portugal, a qualidade da água para consumo humano é verificada com base no Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de Agosto, que procedeu à revisão do Decreto-Lei nº243/2001 de 5 de Setembro, que para além dos aspetos de qualidade, estabelece ainda os princípios de repartição da responsabilidade, pela gestão dos sistemas de abastecimento público [8].

## 2.2. Caracterização das bactérias em estudo

### 2.2.1. Bactérias Coliformes

As bactérias coliformes pertencem à família das *Enterobacteriaceae*. São bactérias Gram negativas, não esporuladas e na forma de bastonete, anaeróbio facultativo e oxidase negativa, fermentam a lactose com formação de gás dentro de 48 h a 35 °C [11]. Tratam-se de um grupo de organismos que podem ser encontrados no solo, nas águas naturais e residuais domésticas, no intestino do homem e de outros animais de sangue quente, sendo que, as bactérias coliformes totais incluem as espécies fecais e as ambientais. A *Escherichia coli* (*E. coli*) e os coliformes fecais (ou termotolerantes) pois toleram temperaturas acima dos 40 °C e reproduzem-se nessa temperatura em menos de 24 horas e constituem um subgrupo das bactérias coliformes totais [4,6-8].

Estas bactérias com capacidade de sobreviver e multiplicar-se na água, não sendo os melhores indicadores da presença de microrganismos patogénicos fecais, constituem, contudo, um bom indicador do estado de higienização e de integridade dos sistemas de distribuição e da presença potencial de biofilmes [6,7,9].

Imediatamente após a desinfecção, devem estar ausentes, pelo que a sua presença indica um tratamento inadequado [7, 9,10].

### 2.2.2. *Escherichia Coli*

A *Escherichia coli* (*E.coli*) pertence à família das *Enterobacteriaceae*, são bactérias Gram negativas, aeróbias e anaeróbias facultativas, lactase positiva e oxidase negativa. Trata-se da bactéria mais representativa do grupo das bactérias coliformes fecais. Esta bactéria tem a característica de ser altamente específica das fezes do homem e animais de sangue quente. Como não se multiplicam em ambiente aquático são, utilizadas como indicadores específicos de poluição fecal [12].

A contagem de *E. coli* tem sido extensivamente utilizada no controlo da qualidade da água e, é considerada indicador específico da qualidade de água destinada a consumo humano [13-15].

A *E. coli* está presente na flora intestinal humana onde, geralmente, não constitui problemas para a saúde. No entanto, noutras partes do corpo, pode causar doenças, como por exemplo, infeções urinárias. A temperatura da água e as concentrações de nutrientes não são, nas redes de distribuição, geralmente suficientes para favorecer a multiplicação da *E. coli* nos biofilmes, pelo que a sua presença fornece uma clara evidência de poluição fecal recente (esgotos, descargas ilegais, entre outros). Dá indicação de que poderão estar presentes outros microrganismos, igualmente de origem fecal, tais como bactérias, vírus e protozoários, esses sim prejudiciais à saúde [12,16,17].

### 2.2.3. Número de colónias a 22 °C e a 37 °C

O número de colónias, também designada por número de microrganismos viáveis, contagem total ou mesófilas a 37 °C e 22 °C, engloba um largo espectro de microrganismos heterotróficos, incluindo bactérias e fungos da flora microbiana natural da água (tipicamente não nocivos), e os que têm origem em diversas fontes de poluição [18].

O espectro de microrganismos detetado inclui organismos sensíveis aos processos de desinfecção (p.ex. cloragem, ultravioleta e ozonização), tais como as bactérias coliformes; organismos resistentes aos processos de desinfecção, como os formadores de esporos; e organismos que rapidamente proliferam na água tratada na ausência de desinfetante residual. No entanto, este teste, deteta apenas uma parte dos microrganismos presentes na água. Podem ocorrer em grande número nas águas brutas, apresentando número de colónias muito variáveis, tanto em amostras colhidas em diferentes locais, como em amostras consecutivas no mesmo local. Alguns destes organismos têm a capacidade de se multiplicar na água e em superfícies em contacto com a água, tais como os biofilmes, e têm uma capacidade de proliferar em algumas das operações dos processos de tratamento. Os principais fatores determinantes para o seu crescimento na água são a temperatura, a disponibilidade de nutrientes, incluindo o carbono orgânico assimilável, a ausência de desinfetante e a estagnação da água. A sua pesquisa tem pouco valor como indicador da presença de patogénicos, mas pode ser muito útil na monitorização operacional como indicador da eficiência do tratamento e da desinfecção da água, bem como da higienização e da integridade do sistema de distribuição e monitorização da presença de biofilmes [18].

Os microrganismos a 22 °C e 37 °C na água de consumo humano não representam uma preocupação em termos de saúde pública. No entanto, a contagem de bactérias heterotróficas presentes na água, pode incluir potenciais "patogénicas oportunistas", pelo que quando detetados valores elevados devem ser pesquisadas as suas causas, pois pode-se tratar de um aviso de poluição séria [18].

#### **2.2.4. *Clostridium perfringens***

O *Clostridium perfringens* é de uma bactéria anaeróbia e Gram positiva, redutora de sulfito e formadora de esporos. Trata-se de um indicador de poluição hídrica de origem fecal remota ou intermitente, devido aos longos períodos de permanência da água e de resíduos sedimentáveis, contendo esporos, em órgãos do sistema de armazenamento e distribuição, às condições de sobrevivência dos seus esporos, e também devido ao facto de não se multiplicarem na maioria dos ambientes aquáticos [19].

É comum no trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente, encontrando-se largamente distribuído na natureza, principalmente no solo e em águas contaminadas com fezes [19].

O *Clostridium perfringens* é resistente à depuração natural da água, formando esporos que são excepcionalmente resistentes a condições ambientais aquáticas adversas, incluindo radiação ultravioleta, temperatura, valores de pH extremos e processos de desinfeção, tal como a cloração, podendo sobreviver nesta forma por períodos prolongados [19,20].

Em situações de incumprimento deste parâmetro, deve-se investigar todo o sistema de abastecimento por forma a identificar-se a existência de risco para a saúde humana devido à presença de outros microrganismos patogénicos como, por exemplo, o *Cryptosporidium* [9,19].

O *Clostridium perfringens* tem um potencial patogénico, devido à produção de toxinas, podendo provocar dores abdominais e diarreias [19,20].

Deve ser tido em conta para a análise de risco para a saúde pública que o *Clostridium perfringens* constitui um bom indicador da eficácia, relativamente a vírus e protozoários, da etapa de desinfeção e dos processos físicos de tratamentos, tais como a filtração [19,20].

#### **2.2.5. *Enterococcus faecalis***

Os *Enterococcus* são bactérias Gram positivas, anaeróbias facultativas e ocorrem isoladamente, em pares ou em cadeias curtas, são bastante resistentes a soluções com elevadas concentrações de sal e crescem a temperaturas que variam entre 10 a 45 °C e a pH ótimo 9,6 [16,22]. Estes constituem um subgrupo de um grupo de organismos definidos como *Streptococcus faecalis*, compreendendo espécies do género *Streptococcus*. Este subgrupo é composto pelas espécies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* e *Enterococcus hirae*, e veio substituir o parâmetro indicador *Streptococcus faecalis*, por ser mais específico de uma eventual poluição de origem fecal. No entanto, alguns *Enterococcus*

*faecalis*, isolados na água, podem ocasionalmente também ser originários de outros habitats, incluindo o solo, na ausência de poluição fecal direta. Para além de indicadores de poluição fecal, são ainda considerados como bons indicadores, após reparação ou intervenção no sistema de distribuição [16,22,23].

A maioria das espécies não se multiplica em ambientes aquáticos. O número de *Enterococcus faecalis* em fezes humanas é geralmente numa ordem de grandeza menor do que a de *E. coli* e tendem a sobreviver mais tempo em ambientes aquáticos, sendo mais resistentes à desinfeção por cloro [16,22].

A presença de *Enterococcus faecalis* na água tratada fornece evidências de contaminação fecal recente, e a sua deteção deve levar à consideração de medidas adicionais, que podem incluir repetição da amostragem e investigação de potenciais fontes de contaminação, tais como tratamento inadequado ou situações anómalas que afetam a integridade do sistema de distribuição [22,24].

No caso de uma contaminação de origem fecal, podem estar presentes microrganismos patogénicos (bactérias, vírus e protozoários) os quais podem representar um elevado risco para a saúde pública. A manifestação mais comum na saúde deste tipo de contaminação através da água é o desconforto gastrointestinal (náuseas, vómitos e diarreias), sendo, de forma geral, de curta duração [22].

### 2.3. Decreto-lei nº 306/2007, de 27 de agosto

O Decreto-lei N.º 306/2007, de 27 de agosto, que estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, tendo por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água e define os valores paramétricos para as Bactérias Coliformes, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Clostridium perfringens* e Microrganismos viáveis a 22 °C e 37 °C, conforme se encontra evidenciado na Tabela 1 [8].

Este decreto-lei define:

- As normas de qualidade a que a água destinada ao consumo humano deve respeitar;
- As obrigações de qualidade de água disponibilizada pelas entidades gestoras;
- O programa de controlo da qualidade da água que as entidades gestoras devem dispor;
- O procedimento em caso de incumprimento;
- As regras de aptidão dos laboratórios de ensaio;
- As regras de fiscalização e regime de contra - ordenação.

**Tabela 1** - Valores paramétricos definidos no Decreto-lei N.º 306/2007 de 27 de Agosto para os parâmetros microbiológicos [8].

Parâmetro	Valor Paramétrico	Observações
Bactérias Coliformes	0 ufc/100 mL	
<i>Escherichia coli</i>	0 ufc/100 mL	
<i>Enterococcus</i>	0 ufc/100 mL	
<i>Clostridium perfringens</i>	0 ufc/100 mL	
Microrganismos viáveis a 22 °C	Sem alteração anormal	Não é desejável que o seu valor seja superior a 100 ufc/mL
Microrganismos viáveis a 37 °C	Sem alteração anormal	Não é desejável que o seu valor seja superior a 20 ufc/mL

## 2.4. Nutrição e crescimento de microrganismos

Em qualquer ser vivo, o crescimento é um processo dinâmico, que requer energia e nutrientes para a síntese dos componentes celulares e manutenção da célula. De todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados nas suas exigências nutricionais. Alguns podem crescer exigindo, apenas, substâncias inorgânicas, enquanto outros estão mais próximos dos organismos superiores, nas suas exigências em compostos orgânicos complexos [2,25].

A água representa cerca de 80-90% do peso total das células do peso total das células sendo, por isso, um fator fundamental. Outros nutrientes essenciais são o carbono, oxigénio, hidrogénio, azoto, enxofre, magnésio, fósforo, considerados macronutrientes, isto é, nutrientes que são exigidos em quantidades relativamente elevadas e que desempenham papéis fundamentais na estrutura e metabolismo da célula [2, 25].

Os micronutrientes ou elementos mínimos, exigidos em menores quantidades mas funcionalmente muito importantes, incluem o manganês, cobalto, cobre, molibdénio, zinco. Muitos deles são essenciais para a atividade de certas enzimas funcionando cofactores [2,25].

As exigências em carbono, azoto, enxofre e oxigénio não podem ser descritas de uma forma simplista, pois os microrganismos diferem relativamente à forma química específica sob a qual estes elementos podem ser utilizados como nutrientes. O carbono é um dos mais importantes elementos necessários ao crescimento microbiano. Todos os organismos

necessitam de carbono, embora os microrganismos sejam extremamente diversificados relativamente ao tipo e número de compostos orgânicos que podem utilizar [2,25].

Os organismos que fazem fotossíntese e as bactérias que obtêm energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos, usam, tipicamente, a forma mais oxidada de carbono ( $\text{CO}_2$ ), como única ou principal fonte de carbono celular. A conversão de dióxido de carbono em constituintes celulares orgânicos é um processo redutor que requer energia. Nestes microrganismos, uma parte dessa energia é de origem luminosa ou proveniente da oxidação de compostos inorgânicos reduzidos. São produtores primários de matéria orgânica e, em última análise, deles depende a vida na terra. Todos os outros organismos obtêm carbono, principalmente a partir dos compostos orgânicos que funcionam, de um modo geral, como fontes de carbono e energia [2,25].

#### 2.4.1. Cinética do crescimento em descontínuo

O crescimento bacteriano refere-se ao aumento do número de bactérias e não a um aumento no tamanho das células individuais.

Para um dado microrganismo, crescendo em descontínuo, em condições adequadas e bem definidas, o tempo individual de duplicação não rigorosamente o mesmo. No entanto, há um tempo médio de duplicação que, nestas condições, pode ser usado para caracterizar a cinética de crescimento da população microbiana. No caso de populações, o termo tempo de duplicação  $t_d$  ou geração, é usado como medida do tempo que leva a população a duplicar. Se houver  $N_0$  células viáveis no tempo zero, então, após uma geração haverá  $2N_0$  células e estas darão origem a  $2^2N_0$ . Após  $n$  gerações, o número de células será [2,25]:

$$N = 2^n N_0 \quad (1)$$

onde,  $n$  representa o número de gerações. Se a população estiver a crescer durante o tempo  $t$ , então:

$$n = \frac{t}{t_d} \quad (2)$$

e a equação geral para o crescimento de células pode escrever-se:

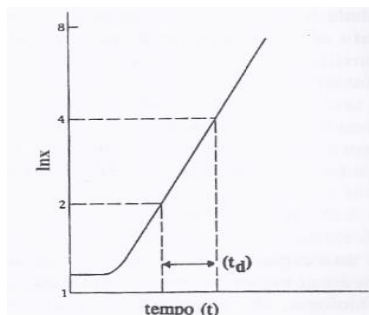
$$N_t = 2^n N_0 \quad (3)$$

onde  $N_t$  é o número de células presentes no tempo  $t$ . este tipo de aumento é conhecido por crescimento exponencial [2,25].

Se esta equação for expressa em termos de logaritmos, então:

$$\ln N_t - \ln N_0 = n \cdot \ln 2 = \frac{t}{t_d} \ln 2 = 0,693 \frac{t}{t_d} \quad (4)$$

Para células crescendo exponencialmente, se representarmos graficamente os logaritmos naturais da densidade populacional em função do tempo, obtém-se uma regressão linear. Por isso usam-se representações semilogarítmicas das curvas de crescimento (Figura 2) [2,25].



**Figura 2** - Representação semilogarítmica do crescimento exponencial. A taxa de crescimento ( $\mu$ ) corresponde ao declive da reta e  $t_d$  corresponde ao tempo de duplicação.

Por outro lado se assumirmos que, numa cultura microbiana, em condições de crescimento equilibrado, a taxa de aumento de população, no tempo ( $t$ ), é proporcional à densidade populacional ( $x$ ), nesse instante, então:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (5)$$

onde a constante de proporcionalidade,  $\mu$ , representa a taxa de crescimento, cuja dimensão é o inverso do tempo ( $t^{-1}$ ) [2,25].

Por integração desta equação:

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \quad (6)$$

onde  $x_0$  e  $x_t$  representam os valores da densidade populacional nos tempos 0 e  $t$ , respectivamente. Esta expressão traduz o carácter exponencial do crescimento [2,25].

Por sua vez, esta equação é equivalente a:

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \quad (7)$$

Que corresponde à reta de declive igual a  $\mu$ , que se observa quando se representa o logaritmo natural da densidade populacional em função do tempo [2,25].

A fase de crescimento que assim se define, corresponde a um aumento exponencial da densidade populacional. Nesta fase, o crescimento diz-se equilibrado, ou seja todos os constituintes da biomassa presente aumentam com a mesma taxa específica [2,25].

A taxa específica constante de crescimento, relaciona-se com o tempo médio de duplicação ( $t_d$ ) para a população, por substituição de  $x_t = 2x_0$  e  $t = t_d$  na função exponencial (7). Assim:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (8)$$

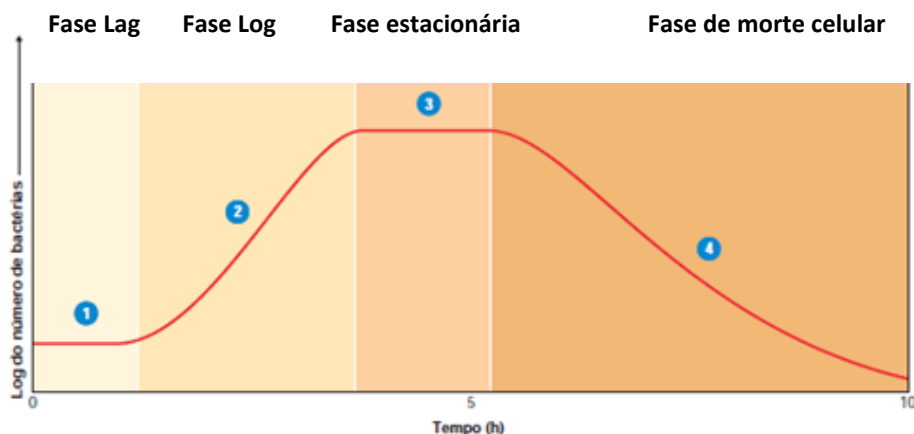
A taxa específica de crescimento de uma cultura é um parâmetro muito importante, não só porque o seu uso permite prever como evoluirá a concentração de um microrganismo ao longo do tempo, mas também, porque é um indicador da resposta dum microrganismo às condições e ao meio de crescimento.

O valor de  $\mu$  depende da estirpe e é fortemente influenciado pelas condições o meio de cultura [2,25].

### 2.4.2. Curva de crescimento

O método tradicional de estudar o crescimento microbiano tem sido o da cultura em descontínuo ou sistema fechado (batch) [2,25].

Consideremos um meio de cultura líquido com uma fonte de energia adequada, os nutrientes necessários, condições físicas e químicas favoráveis. Se nele inocularmos uma população viável de microrganismos e seguirmos o seu crescimento ao longo do tempo, obter-se-á uma curva que mostra as várias fases de crescimento características do crescimento de populações microbianas num sistema fechado (Figura 3).



**Figura 3** - Ciclo de crescimento microbiano [25].

### 1) A fase de latência (Fase lag)

Durante um certo tempo, o número de células muda pouco, pois elas não se reproduzem imediatamente num novo meio. Esse período de pouca ou nenhuma divisão é chamado de fase lag (fase de latência), podendo durar uma hora ou vários dias. Durante esse tempo, contudo, as células não estão dormentes. A população microbiana passa por um período de intensa atividade metabólica, envolvendo principalmente a síntese de enzimas e várias moléculas [2,25].

### 2) A fase logarítmica (Fase Log)

As células começam a dividir-se e entram num período de crescimento, ou aumento logarítmico, chamado de fase log ou fase exponencial de crescimento. O valor da taxa específica de crescimento mantém-se, então, invariável no tempo, atingido o seu valor máximo, ( $\mu = \mu_{max}$ ), e corresponde ao declive da reta que define o crescimento nesta fase. A reprodução celular é mais ativa durante esse período. A fase log é o momento de maior atividade metabólica, sendo o preferido para fins industriais, pois o produto precisa ser produzido de maneira eficiente [2,25].

### 3) A fase estacionária

O esgotamento de nutrientes e/ou acumulação de produtos inibitórios do metabolismo, levam a que os microrganismos deixem de se dividir (fase estacionária). Nesta fase não estão metabolicamente inactivos. Alguns microrganismos podem sobreviver longos períodos sem perda de viabilidade, usando as reservas endógenas, enquanto que outros começam a morrer, logo que entram na fase estacionária, levando a que a taxa de crescimento se anule [2,25].

### 4) A fase de morte celular

A fase de morte ocorre após a fase estacionária, devido a efeitos de metabolitos tóxicos, ou à autólise das células por enzimas líticas. A morte das células é, normalmente, definida como a perda da capacidade de divisão celular, processo irreversível do qual resulta o decréscimo da população viável ao longo do tempo. A morte é também, uma função exponencial e diminui com o tempo, de acordo com a equação:

$$\ln x_t = \ln x_0 - \mu_d t \quad (9)$$

onde  $x_t$  e  $x_0$ , representam valores da população nos tempos  $t$  e  $0$  e em que  $\mu_d$  (declive da respectiva reta) se define como a taxa específica de morte, cuja dimensão é o inverso do tempo ( $t^{-1}$ ) [2,25].

### 2.4.3. Fatores que afetam o crescimento microbiano

Os fatores necessários para o crescimento microbiano podem ser divididos em duas categorias principais: físicos e químicos. Os fatores físicos incluem temperatura, pH e pressão osmótica. Os fatores químicos incluem fontes de carbono, nitrogénio, enxofre, fósforo, oxigénio, micronutrientes e fatores orgânicos de crescimento [2,25].

#### a) Concentração de nutrientes

Um dos fatores mais importantes para o crescimento microbiano é o carbono. O carbono é o esqueleto estrutural da matéria viva. Metade do peso seco de uma célula bacteriana típica é composta por carbono [2,25].

Além de carbono os microrganismos necessitam de outros elementos para sintetizar material celular. A síntese de proteínas requer quantidades consideráveis de azoto e enxofre. A síntese de DNA e RNA também requer azoto e algum fósforo. O azoto constitui cerca de 14% do peso seco da célula bacteriana, e o enxofre e o fósforo juntos constituem cerca de 4%.

O enxofre é utilizado para sintetizar aminoácidos como a tiamina e a biotina. O fósforo é essencial para a síntese de ácidos nucleicos e dos fosfolípidos das membranas celulares [2,25].

A taxa específica de crescimento microbiano ( $\mu$ ) é uma função da concentração de nutrientes presentes no meio de cultura. A sua dependência de um nutriente ( $S$ ), mantendo-se invariáveis os outros parâmetros que afetam o valor de  $\mu$  pode ser expressa pela equação de Monod:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (10)$$

onde  $\mu_{max}$  representa o valor de  $\mu$  quando  $S$  se encontra em concentração saturante e  $K_s$ , uma constante de saturação (numericamente igual à concentração de substrato ( $S$ ) que permite a taxa de crescimento:  $\mu = \frac{\mu_{max}}{2}$  [2,25].

A curva hiperbólica representada na Figura é baseada nesta equação e estabelece a relação entre a variação da taxa específica e a concentração do nutriente limitante do crescimento. Se as condições do meio de cultura de mantiverem constantes e para concentrações saturantes do nutriente limitante ( $S$ ), a taxa específica de crescimento atinge o seu valor máximo  $\mu_{max}$  [2,25].

Para valores de  $S$  não saturantes, a taxa específica de crescimento  $\mu$  diminui à medida que  $S$  decresce. Esta diminuição não se torna contudo, evidente até que se atinjam concentrações

relativamente baixas do substrato limitante. Nesta altura, os sistemas de permease das células não são mais capazes de manter as concentrações intracelulares saturantes e a taxa específica de crescimento diminui (Figura 4) [2,25].



**Figura 4** - Variação da taxa específica de crescimento,  $\mu$ , de um microrganismo com a concentração de um nutriente essencial (S) limitante do crescimento [2].

#### b) Temperatura

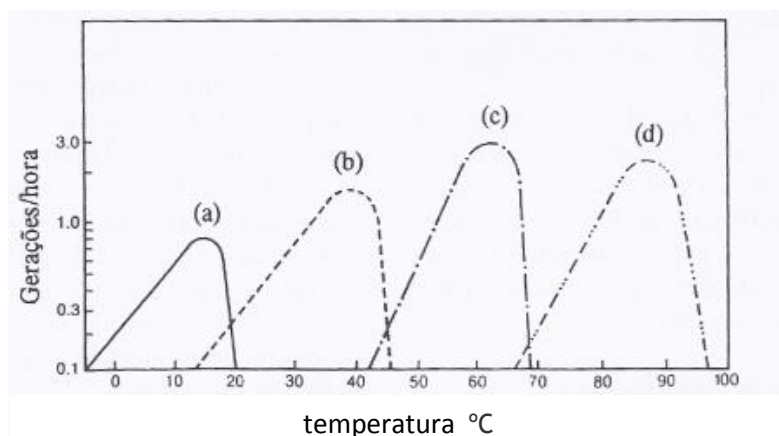
A temperatura é um dos parâmetros mais importantes, que influenciam o crescimento e sobrevivência dos microrganismos.

Sabe-se que a taxa das reacções químicas é uma função directa da temperatura e obedece à relação, originalmente descrita por Arrhenius:

$$\log v = \frac{-\Delta E_a}{2,303 RT} + C \quad (11)$$

onde  $v$  representa a velocidade da reacção,  $E_a$  a energia de activação da reacção,  $R$  a constante dos gases perfeitos e  $T$ , a temperatura absoluta expressa em graus Kelvin ( $^{\circ}k$ ). Assim a representação gráfica da velocidade duma reacção química em função do inverso da temperatura ( $T^{-1}$ ), origina uma linha reta com um declive negativo [2,25].

Cada microrganismo tem valores precisos de temperatura máxima e mínima que permitem o seu crescimento e de temperatura ótima, à qual é máxima a sua taxa de crescimento [2,25,26].



**Figura 5** - Relação temperatura / taxa de crescimento de um microrganismo (a) psicrófilo, (b) mesófilo, (c) termófilo, (d) hipertermófilo [2].

Os valores numéricos das temperaturas cardeais (mínimo, ótimo e máximo) e a gama de temperaturas que permitem o crescimento variam, significativamente, entre os microrganismos, sendo comum definir-se, embora com alguma arbitrariedade, quatro grandes grupos: psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos (Figura 5) [2,25].

Distinção deve, ainda, ser feita entre microrganismos termofílicos e termodúricos ou termorresistentes. Os primeiros crescem a temperaturas relativamente elevadas, e os microrganismos termodúricos resistem ou podem tolerar choques térmicos elevados, durante curtos intervalos de tempo [2,25].

A maioria dos microrganismos cresce bem nas temperaturas ideais para os seres humanos. Contudo, certas bactérias são capazes de crescer em extremos de temperatura que certamente impediriam a sobrevivência de quase todos os organismos eucarióticos. A maioria das bactérias cresce em uma faixa limitada de temperatura, sendo que há somente 30 °C de diferença entre a temperatura máxima e a mínima de crescimento. Elas crescem pouco nas temperaturas extremas considerando sua faixa ideal [2,25].

Cada espécie bacteriana cresce a uma temperatura mínima, ótima e máxima específica. A temperatura mínima de crescimento é a menor temperatura na qual a espécie pode crescer. A temperatura ótima de crescimento é a temperatura na qual a espécie cresce melhor. A temperatura máxima de crescimento é a maior temperatura na qual o crescimento é possível. Quando é feito um gráfico relacionando a resposta do crescimento com a variação da temperatura, pode-se observar que a temperatura ótima de crescimento normalmente está deslocada para perto da variação máxima de temperatura; acima dessa temperatura, a velocidade de crescimento decresce rapidamente. Isso ocorre provavelmente porque a temperatura elevada inativou os sistemas enzimáticos da célula [2,25].

Os psicrófilos, por exemplo, foram inicialmente considerados microrganismos capazes de crescer a 0 °C. Contudo, existem dois grupos diferentes capazes, de crescer nessa temperatura. Um grupo, composto somente por psicrófilos, pode crescer a 0 °C, mas tem uma temperatura ótima de crescimento de cerca de 15 °C. A maioria desses microrganismos é tão sensível a temperaturas mais altas que não poderá crescer mesmo em uma temperatura ambiente razoável (25 °C). Encontrados essencialmente nas profundezas dos oceanos ou em certas regiões polares, esses microrganismos não causam problemas na preservação de alimentos. O outro grupo que pode crescer a 0 °C tem temperaturas ótimas de crescimento mais elevadas, geralmente de 20 a 30 °C, e não pode crescer em temperaturas acima de 40 °C. Os organismos desse tipo são mais comuns que os psicrófilos e são os mais prováveis de serem encontrados na deterioração de alimentos em baixa temperatura, pois crescem em temperaturas utilizadas em refrigeradores [2,25,52].

#### c) pH

O pH refere-se à acidez ou alcalinidade de uma solução. Cada microrganismo tem um valor de pH ótimo, desenvolvendo-se numa gama de valores que permitem o seu crescimento [25,26,52].

A maior parte dos ambientes naturais têm valores de pH entre 5 e 9, o que é favorável ao crescimento da maioria dos microrganismos. Poucas bactérias crescem num pH ácido abaixo de 4. Essa é a razão pela qual muitos alimentos como os pickles e muitos queijos são protegidos da deterioração pelos ácidos produzidos pela fermentação bacteriana. No entanto, algumas bactérias, chamadas de acidófilas, são resistentes à acidez. Um tipo de bactéria quimioautotrófica, encontrada na água de drenagem das minas de carvão e que oxida enxofre para formar ácido sulfúrico, pode sobreviver em pH 1. A alcalinidade também inibe o crescimento microbiano, mas raramente é utilizada para preservar os alimentos. Os alcalófilos desenvolvem-se a valores elevados de pH (8,5 a 11,5) e os neutrófilos preferem pH entre 5,5 a 8,0 [2,25,52].

#### d) Actividade da água

Os microrganismos obtêm a maioria dos seus nutrientes da água presente no seu meio ambiente. Portanto, eles requerem água para seu crescimento, sendo que sua composição é de 80 a 90 % de água. Para todos os organismos a água é o principal componente da célula (cerca de 80 %) e é o meio onde ocorrem as reacções celulares [2,25,26].

A disponibilidade da água para um organismo expressa-se, normalmente, em termos físicos, como actividade da água ( $a_w$ ), cujos valores variam entre 0 e 1 [2,25].

Os microrganismos diferem bastante na sua capacidade para se adaptarem a habitats com baixo  $a_w$ . Alguns microrganismos conseguem crescer numa gama relativamente ampla de actividade de água (ou pressão osmótica), mas a maior parte prefere, ou só consegue crescer a valores de  $a_w$  de cerca de 0,98 ou superiores. Pressões osmóticas elevadas têm como efeito remover a água necessária para a célula. Quando uma célula microbiana está em uma solução cuja concentração de solutos é mais elevada que dentro da célula (o ambiente é hipertónico), a água atravessa a membrana celular para o meio com a concentração mais elevada de soluto. Essa perda osmótica de água causa uma plasmólise, ou encolhimento do citoplasma celular. A importância desse fenómeno é que o crescimento da célula é inibido assim que a membrana plasmática se separa da parede celular [2,25].

Portanto, a adição de sais (ou outros solutos) em uma solução, e o aumento resultante na pressão osmótica, pode ser utilizada para preservar alimentos. Peixe salgado, mel e leite condensado são preservados por esse mecanismo, sendo que as concentrações elevadas de sal ou açúcar removem a água fora de qualquer célula microbiana presente e conseqüentemente impedem seu crescimento. Esses efeitos da pressão osmótica estão em parte relacionados com o número de moléculas e iões dissolvidos num volume de solução. Alguns microrganismos, chamados de halófilos extremos, são tão adaptados a concentrações elevadas de sais que acabam de fato requerendo sua presença para que ocorra seu crescimento. Nesse caso, eles podem ser denominados halófilos obrigatórios. Existem ainda os halófilos facultativos que não requerem concentrações elevadas de sal, mas são capazes de crescer em concentrações de até 2 % de sal [25].

#### **e) Micronutrientes**

Os microrganismos requerem quantidades muito pequenas de outros elementos minerais, como ferro, cobre, molibdénio e zinco. A maioria é essencial para as funções de certas enzimas, geralmente como cofactores. Embora esses elementos algumas vezes sejam adicionados ao meio de cultivo laboratorial, eles costumam estar naturalmente presentes na água da torneira e em outros componentes dos meios de cultivo [2,25].

#### **f) Oxigénio**

O comportamento dos microrganismos em relação ao oxigénio é heterogéneo. Os microrganismos aeróbios estritos estão dependentes da respiração aeróbia para fazer face às suas exigências energéticas, utilizando assim o oxigénio molecular como aceitador final de electrões [2,25].

Os microrganismos anaeróbicos facultativos podem utilizar o oxigénio quando ele está presente, mas são capazes de continuar a crescer utilizando a fermentação ou a respiração

anaeróbica quando o oxigénio não está disponível. Um exemplo de um microrganismo anaeróbico facultativo é a *Escherichia coli*, encontrada no trato intestinal humano [2].

Os microrganismos anaeróbicos obrigatórios são bactérias incapazes de utilizar o oxigénio molecular para as reacções produtoras de energia. Pelo contrário a presença de oxigénio é-lhes letal, pois leva à produção de peróxidos e de radicais livres de oxigénio como o superóxido  $O_2^-$ . Os organismos aeróbios possuem enzimas (superóxidos-dismutase e catalase ou peroxidase) que decompõem estes produtos, o que não acontece com os microrganismos anaeróbios estritos. O género *Clostridium*, que contém espécies que causam o tétano e o botulismo, é o exemplo mais conhecido de organismos anaeróbios estritos [2,25].

#### 2.4.4. Meios de cultura

O conhecimento das exigências nutricionais dos microrganismos permite elaborar meios que promovam o seu crescimento em meios de cultura. Para cultivar um determinado microrganismo temos que ter em conta vários parâmetros na selecção do meio. O meio de cultura deve conter os nutrientes adequados para o microrganismo específico que queremos cultivar (Tabela 2). Deve conter também quantidade de água suficiente, pH apropriado, um nível conveniente de oxigénio e deve ser estéril [2,25].

Quando se deseja o crescimento das bactérias num meio sólido, um agente solidificante como o agar é adicionado ao meio. O agar é um polissacarídeo complexo derivado de uma alga marinha que tem sido utilizado há muito tempo para deixar alimentos como geleias [2,25].

**Tabela 2** - Tipos de Meios de cultura

Tipo (Meio de Cultura)	Finalidade
Quimicamente definido	Crescimento de quimioautotróficos e fotoautotróficos; ensaios microbiológicos.
Complexo	Crescimento da maioria dos microrganismos quimioheterotróficos.
Enriquecimento	Similar ao meio selectivo, mas elaborado para aumentar o número de microrganismos de interesse até níveis detectáveis.
Redutor	Crescimento de anaeróbios obrigatórios.
Selectivo	Supressão de microrganismos indesejados; favorecimento dos microrganismos de interesse.
Diferencial	Diferenciação das colónias dos microrganismos de interesse em relação aos outros.

## **Capítulo 3 - Fundamentos práticos**

## Capítulo 3 - Fundamentos práticos

### 3.1. A Labinter

Este trabalho foi desenvolvido numa entidade privada denominada Labinter - Laboratório Alimentar, Lda, que se encontra sediado na Covilhã.

Apostando claramente na qualidade, a Labinter, adoptou os requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025 e da NP EN ISO 9001. A Labinter é atualmente um Laboratório Acreditado (L0562) para as matrizes de águas de consumo humano, alimentos e agro-alimentares e ainda para a colheita de amostras de águas de consumo humano para os parâmetros microbiológicos. A acreditação foi concedida pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) (Tabela 3). A certificação do laboratório (NP EN ISO 9001) para recolha de amostras e realização de análises microbiológicas a superfícies, alimentos, águas, manipuladores e ambiente, foi concedida pela entidade certificadora SGS (PT 14/04722).

Todas as empresas do sector alimentar devem proceder à realização de análises laboratoriais regulares que comprovem o respeito dos critérios microbiológicos estabelecidos, dando orientações quanto à aceitabilidade dos géneros alimentícios e dos seus processos de fabrico, manuseamento e distribuição.

Devem definir procedimentos de amostragem e análise microbiológica de grupos de alimentos, bem como a indicação da utilização de critérios microbiológicos na verificação e validação de processos do sistema de análise de perigos e controlo de pontos críticos (HACCP) e de outras medidas de higiene vinculadas pelo Regulamento (CE) n.º 852/2004, dando cumprimento ao Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de Novembro de 2005 (relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, alterado pelo Regulamento (CE) n.º 1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007).

A Labinter realiza uma vasta gama de análises laboratoriais para controlo da qualidade dos produtos alimentares e controlo higiénico dos processos nos mais variados setores de atividade:

- Análises microbiológicas de águas (Tabelas 3 e 4);
- Análises microbiológicas e físico-químicas de alimentos: carnes e derivados, leite e derivados, pastelaria, pescado, pré-cozinhados, conservas, etc.
- Controlo higio-sanitário das superfícies, utensílios, equipamentos, mãos manipuladores.

Possui ainda técnicos certificados pela Associação de Laboratório Acreditados de Portugal (Relacre) para a realização de colheita de amostras de águas de consumo humano. Trata-se, também, de um laboratório referenciado pela Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos (ERSAR), para controlo da qualidade da água para consumo humano.

As análises são realizadas em conformidade com as normas em vigor (nacionais e/ou internacionais): Normas Portuguesas (NP) do Instituto Português da Qualidade, Normas Europeias do “European Committee for Standardization” (EN) e Normas Internacionais do “International Organization for Standardization” (ISO).

A seleção dos métodos de ensaio utilizados, incluindo métodos de amostragem, deve satisfazer, as necessidades do cliente e serem apropriados para os ensaios que realiza, sendo este mantido informado dos métodos selecionados. A Labinter deve garantir que utiliza a edição em vigor de cada norma, a menos que não seja adequado ou possível fazê-lo. Quando necessário, a norma deve ser complementada com pormenores adicionais de forma a garantir uma aplicação consistente.

A Labinter participa, ainda, em ensaios interlaboratoriais de águas e alimentos, organizados pelo HPE (Public Health England) em parceria com o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P., de forma a garantir a qualidade do seu sistema de qualidade [28-33].

**Tabela 3** - Ensaio realizados incluídos no âmbito da acreditação

Produto	Ensaio	Método
<b>Águas</b>		
<b>Água de Consumo</b>	Colheita de amostras para os ensaios microbiológicos constantes deste anexo técnico	ISO 19458:2006 [34]
	Contagem de Microrganismos a 22 °C Incorporação	ISO 6222:1999 [35]
	Contagem de Microrganismos a 37 °C Incorporação	ISO 6222:1999 [35]
	Pesquisa e quantificação de Bactérias coliformes Método de filtração por membrana	MI 001 V.1.2 (2012-04-18) [36]
	Pesquisa e Quantificação de <i>Clostridium perfringens</i> Método de filtração por membrana	EA Parte 6 Método B The Microbiology of Drinking Water (2010) [37]
	Pesquisa e quantificação de <i>E.coli</i> Método de filtração por membrana	MI 001 V.1.2 (2012-04-18) [36]
	Pesquisa e quantificação de <i>Enterococcus</i> Método de filtração por membrana	ISO 7899-2:2000 [38]

**Tabela 4** - Ensaios realizados não incluídos no âmbito da acreditação.

Produto	Ensaio	Método
<b>Águas</b>		
Águas de Consumo	Pesquisa e Quantificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ISO 16266:2006 [40]
	Pesquisa e Quantificação de <i>Staphylococcus</i>	NP 4343:1998 [41]
	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	ISO 19250:2010 [42]

### 3.2. Acreditação e validação de métodos de ensaio

Actualmente, e devido às exigências do sector, os laboratórios de ensaios/calibração tornam-se mais credíveis quando se tratam de entidades acreditadas. O sistema nacional de acreditação é gerido pelo Instituto Português da Acreditação (IPAC), e consiste num conjunto de regras e procedimentos usados para o reconhecimento da competência técnica [42,43].

No entanto, a acreditação acarreta custos (monetário, rentabilidade de tempo e pessoal qualificado) elevados, visto que exige um cumprimento bastante apertado das respectivas atribuições (âmbito da acreditação).

Um laboratório acreditado tem que cumprir com todos os requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025 [30], bem como ir ao encontro do que se encontra definido pelo IPAC através do guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025 (OGC 001) [44].

No que diz respeito aos procedimentos técnicos, o Laboratório tem que evidenciar a validação dos métodos de ensaio e tem que garantir a qualidade dos resultados e do seu desempenho.

A validação do método é a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização pretendida são satisfeitos [31].

A validação dos métodos em microbiologia deve reflectir as condições reais dos ensaios.

Este objetivo deve ser alcançado utilizando amostras contaminadas naturalmente ou amostras contaminadas artificialmente com um nível de contaminação pré-definido. O analista deve estar ciente que a adição de microrganismos contaminantes a uma matriz simula, de modo superficial, uma contaminação natural. No entanto, esta parece ser, na maioria das vezes, a

melhor e a única solução. A extensão da validação necessária depende do método em estudo e da sua aplicação.

De acordo com a Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração, todos os laboratórios que queiram implementar os seus próprios métodos de análise têm que ter em consideração o ponto 5.4 Métodos de ensaio e calibração e validação dos métodos descrito nesta norma [30,43,45].

Os laboratórios devem utilizar métodos e procedimentos adequados para a realização de todos os ensaios dentro do seu âmbito de atividade. Os procedimentos têm que incluir amostragem, manuseamento, transporte, armazenamento e preparação dos itens a ensaiar e, quando apropriado, uma estimativa da incerteza de medição bem como técnicas estatísticas para análise dos dados de ensaio [30,43,45-51].

A introdução de métodos de ensaio desenvolvidos pelo laboratório para seu próprio uso deve ser uma atividade planeada e atribuída a pessoal qualificado, dotado dos recursos apropriados. Os planos devem ser atualizados à medida que se efetua o desenvolvimento e deve ser assegurada uma comunicação efetiva entre todo o pessoal envolvido [42,43,45].

O laboratório deve validar métodos normalizados quando aplicados a matrizes não especificadas na norma.

Métodos microbiológicos qualitativos, onde os resultados são expressos como detectado / não detectado e em procedimentos de confirmação e identificação, devem ser validados calculando, se apropriado, a especificidade, a exactidão, o desvio positivo, o desvio negativo, o limite de detecção, o efeito matriz, a repetibilidade e a reprodutibilidade [42,43,45].

#### Limite de Detecção

Aplicado a ensaios microbiológicos qualitativos - É o menor número de microrganismos que pode ser detetado, expressos em números que não podem ser estimados com precisão [42,45].

#### Repetibilidade

Aproximação entre os resultados de sucessivas medições da mesma mensuranda, efetuadas nas mesmas condições de medição [42,44,45].

#### Reprodutibilidade

Aproximação dos resultados da mesma mensuranda efectuadas com alteração das condições de medição [42,44,45].

Os métodos microbiológicos quantitativos a repetibilidade, a reprodutibilidade e o limite de detecção, dentro de uma variabilidade definida, devem ser considerados e, se necessário, determinados quantitativamente nos ensaios. As diferenças devido às matrizes devem ser avaliadas quando se analisam diferentes tipos de amostra. Os resultados devem ser avaliados aplicando métodos estatísticos apropriados [42,45].

Os laboratórios devem manter os dados de validação dos sistemas de ensaio comercializados (Kit's), usados no laboratório. Estes dados de validação podem ser obtidos através de ensaios colaborativos ou dados de validação fornecidos pelos fabricantes, estes validados por um organismo reconhecido (AOAC). Se os dados de validação não estão disponíveis ou não são aplicáveis, o laboratório deve responsabilizar-se pela validação completa do método [42,45].

Se for necessário introduzir qualquer modificação de modo a obter-se a mesma especificação do método original, deve-se proceder a ensaios de comparação, utilizando duplicados, de modo a assegurar que esta modificação é válida. O número de amostras ensaiadas e os resultados obtidos têm que ser estatisticamente válidos [42,45].

Em situações da validação estar completa, será necessário efectuar-se a verificação do desempenho, por exemplo, pelo uso de amostras contaminadas artificialmente com recurso a materiais de referência ou através da participação de ensaios interlaboratoriais [42].

### 3.3. Garantia da qualidade dos resultados / controlo da qualidade do desempenho

#### 3.3.1. Controlo da qualidade interno

O controlo de qualidade interno consiste em procedimentos efetuados pelo laboratório para uma avaliação contínua do trabalho desenvolvido. O objectivo principal é assegurar a consistência dos resultados no dia-a-dia e, a sua conformidade com os critérios definidos.

É necessário executar uma planificação de verificações periódicas por forma a demonstrar que a variabilidade (entre analistas e entre equipamentos ou materiais), se encontra sob controlo. Todos os ensaios incluídos no âmbito da acreditação do laboratório têm de ser incluídos na planificação anual.

A planificação pode envolver:

- o uso de amostras contaminadas;
- o uso de materiais de referência;

- participação em ensaios interlaboratoriais;
- ensaios de duplicados;
- avaliação de resultados de ensaios em paralelo.

O intervalo entre estas verificações é influenciado pela construção da planificação e pelo número actual de ensaios [42,45].

### a) Ensaios em duplicado

Recolher uma amostra de controlo de qualidade por matriz e gama de trabalho, de preferência uma amostra natural contaminada. No caso da inexistência de amostras naturalmente contaminadas, deve ser usado o Material de Referência Certificado (MRC) da respetiva estirpe.

Devem-se examinar no mínimo 15 amostras de controlo, para cada um dos métodos por matriz e gama de trabalho, de preferência em dias diferentes e envolvendo todo o equipamento e técnicos que efetuam os ensaios.

O tratamento dos dados obtidos é feito da seguinte maneira:

- Separar os dados de 10 a n, por matriz e gama de trabalho;
- Desprezar os resultados em que o par de resultados é inferior a dez ou pelo menos um dos valores não seja quantificável;
- Para cada matriz e gama de trabalho transformar as contagens aplicando logaritmos (Log D1, Log D2);
- Calcular o módulo da amplitude dos logaritmos,  $R_{Log}$  de cada par de duplicados :

$$|\text{Log D1} - \text{Log D2}| \quad (12);$$

- Calcular a média das amplitudes:  $\bar{R} = \frac{\sum R_{Log}}{n}$  (13)

- Calcular o Critério de Precisão: C.P. =  $3,27 \times \bar{R}$  (14)

- Construir o gráfico e marcar as amplitudes dos duplicados obtidos,

Em que:

LSC - Limite superior de controlo (Critério de Precisão)

LIC - Limite inferior de controlo

## b) Cálculo da incerteza em ensaios microbiológicos

Devem ser efetuadas pelo menos 10 amostras em duplicado ou em paralelo da mesma matriz ou grupo de matrizes, de acordo com o microrganismo / método ou grupo de microrganismos. Esta metodologia deve ser repetida de preferência para diferentes amostras da mesma matriz e em diferentes dias da semana, de forma a cobrir as variações das condições operativas. Após análise dos dados recolhidos ao longo do ano, e estimado o valor da incerteza.

O desvio padrão da reprodutibilidade é calculado com os dados obtidos do controlo de qualidade interno, ou seja, com os resultados dos ensaios efetuados em duplicado e ou em paralelo. Devem ser somente tidos em conta duplicados onde se obteve um número de unidades formadoras de colónias (ufc) superior a 10 [46-49].

Após o cálculo do desvio padrão dos dados, os resultados deverão ser transformados em logaritmo, desta forma facilita a estabilização da variância da reprodutibilidade nos diferentes níveis de contaminação. Deve-se ter em conta as amostras e suas diluições, de modo a se cobrir a gama de concentrações analisadas em rotina [46-49].

De forma a calcular a média dos duplicados para cada amostra  $i$  de  $n$  amostras de uma determinada matriz, deve-se converter os valores em ufc para logaritmos de base 10 [46].

Fórmula de cálculo da variância da reprodutibilidade para cada amostra  $i$ :

$$S_{Ri}^2 = \frac{(Y_{iA} - Y_{iB})^2}{2} \quad (15)$$

$i$  - índice da amostra,  $i = 1$  de  $n$  ( $n \geq 10$ ).

A e B - índices das condições de reprodutibilidade.

Y - resultados transformados em  $\log_{10}$  (ufc/g) ou  $\log_{10}$  (ufc/mL).

De seguida, efectua-se o cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade  $S_R$  para as  $n$  amostras de uma dada matriz:

$$S_R = \sqrt{\left(\sum_i^n \frac{S_{Ri}}{n}\right)^2} \quad (16)$$

O resultado  $S_R = K$  obtido na fórmula anterior é então usado para a obtenção da incerteza experiencial:

$$U = k \times \sqrt{S^2} \quad (17)$$

$k \cong 2$  a um nível de confiança de 95%, de acordo com a tabela t Student

Fator de expansão,  $k$  - fator numérico usado como um multiplicador da incerteza combinada de modo a obter a incerteza expandida [46-49].

### c) Construção de carta guia

Deve-se construir a Carta Guia a partir de contagens obtidas em séries de análises por matriz e gama de trabalho, utilizando para tal, lenticulas de materiais de referência.

A determinação dos limites de controlo é efetuada analisando-se 20 lenticulas de um lote, de preferência em dias diferentes e por diferentes técnicos, usando o equipamento e as condições de um ensaio normal.

Pode-se construir as Cartas Guia com base em apenas 10 ensaios, no entanto esta tem que ser reconstruída assim que se obtiverem 20 resultados.

Para o cálculo dos limites de controlo, as contagens são transformadas em logaritmos decimais, e a partir destes valores calcula-se a média e o desvio padrão da seguinte maneira:

$$\text{Média: } \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (18)$$

$$\text{Desvio Padrão: } s = 0,8865 \times R \quad (19)$$

Sendo:

$n$  = número de ensaios

$X_i$  =  $i$ ésima observação

$\bar{R}$  = amplitude progressiva

Este método de cálculo evita a influência das contagens extremas. Os limites de controlo são calculados da seguinte forma:

#### Limites de Aviso

$$\text{Limite Superior} = \bar{X} + 2s$$

$$\text{Limite Inferior} = \bar{X} - 2s$$

#### Limites de Alarme

$$\text{Limite Superior} = \bar{X} + 3s$$

$$\text{Limite Inferior} = \bar{X} - 3s$$

A carta guia é construída por retransformação dos valores da média, e dos limites de aviso e de alarme, o que resulta numa carta assimétrica. Esta última transformação é feita aplicando o inverso do logaritmo decimal, pelo que a média e os limites passarão a ser:

Média

$$\bar{x} = \overline{10^x} \quad (20)$$

Limites de Aviso

$$\text{Limite Superior} = 10^{x + 2s}$$

$$\text{Limite Inferior} = 10^{x - 2s}$$

Limites de Alarme

$$\text{Limite Superior} = 10^{x + 3s}$$

$$\text{Limite Inferior} = 10^{x - 3s}$$

Critérios de Aceitação

- Existir uma violação dos limites de alarme
- Existirem 2 ou 3 resultados consecutivos fora do mesmo limite de aviso
- Existirem 9 resultados consecutivos do mesmo lado da média
- Existirem 6 resultados que denotem um aumento ou uma diminuição contínua.

#### **d) Realização de amostras cegas**

As amostras cegas são efectuadas com o mesmo fim da realização de ensaios interlaboratoriais (EIL), ou seja, para qualificação do pessoal. Estes são preparados pelo responsável do laboratório e realizados por todos os técnicos e complementam a participação em EIL, visto que são realizados em diferentes alturas.

### **3.3.2 Controlo da qualidade externo**

Os laboratórios devem participar regularmente em EIL que sejam relevantes para o âmbito da acreditação, devendo ser dada preferência a esquemas de EIL que utilizem matrizes apropriadas. O Laboratório deve participar uma vez por ano em ensaios do seu âmbito de acreditação, com resultados satisfatórios.

Os laboratórios devem usar avaliação externa da qualidade, não apenas para detectar problemas no laboratório, mas também para verificar a validade de todo o sistema da qualidade e qualificação do pessoal [42,45].

### **a) Desvio padrão da reprodutibilidade do método proveniente de um estudo interlaboratorial**

Se o método usado em rotina pelo laboratório foi submetido a um estudo interlaboratorial para validação do mesmo, o laboratório poderá usar o desvio padrão da reprodutibilidade do método para estimar a medida da sua incerteza sob certas condições:

As condições são:

- o estudo interlaboratorial de validação do método contemplou correctamente todas as fontes de incerteza (especialmente preparação da amostra e homogeneização);
- a repetibilidade e a reprodutibilidade intralaboratoriais são inferiores ou iguais à repetibilidade e à reprodutibilidade provenientes do estudo interlaboratorial de validação do método, caso contrário recorrer a um teste estatístico adequado, por exemplo teste de F [46-49].

$$U = k \times \sqrt{S^2} \quad (21)$$

### **b) Desvio padrão da reprodutibilidade do método proveniente de um estudo interlaboratorial de avaliação de desempenho**

Se o laboratório participou num ensaio interlaboratorial de avaliação de desempenho pode ser usado o desvio padrão da reprodutibilidade desse ensaio para deduzir a medida da sua incerteza, sob as seguintes condições:

- durante o ensaio interlaboratorial de avaliação de desempenho o método utilizado é o da rotina do laboratório;
- as amostras usadas no ensaio são comparáveis às analisadas no laboratório em rotina;
- um número suficiente de laboratórios participantes nos ensaios usa o mesmo método[46].

### 3.4. Amostragem

O procedimento de amostragem é um elemento importante do programa de controlo da qualidade da água para consumo humano, porque o resultado da análise não corresponderá ao valor real, mesmo que utilizado um método analítico rigoroso, se a amostra não for representativa da água a controlar [34,50].

O Decreto-Lei n.º 30672007, de 27 de Agosto, estabelece a obrigatoriedade da acreditação da colheita das amostras de água ou a certificação dos técnicos de amostragem, entendendo-se ser necessário uniformizar o procedimento de colheita de amostras de água a nível nacional.

No que diz respeito à colheita das amostras, as metodologias adoptadas pelo laboratório são baseadas na norma ISO 19458 e na recomendação ERSAR n.º 03/2010 [34,50].

#### 3.4.1. Metodologia utilizada para Colheita da água para análises microbiológicas

Antes de se iniciar a colheita devem ser tomados todos os cuidados de assepsia.

Os operadores devem cumprir com as regras de higiene pessoal tais como: utilização de vestuário estabelecido, lavagem e desinfeção das mãos, unhas curtas, limpas e sem verniz, não utilizar adornos, e possíveis feridas e cortes cobertas com máscaras impermeáveis adequadas.

Devem-se evitar contactos com outras substâncias, materiais ou produtos para que a amostra seja representativa das características microbiológicas. Os utensílios e recipientes utilizados devem estar esterilizados e estes últimos devem permanecer abertos o menos tempo possível.

Para se determinar a qualidade da água no sistema de distribuição principal, a amostra deve ser recolhida na distribuição principal ou próxima do mesmo. O técnico deve assegurar que não existe contaminação da superfície externa da torneira [34,50].

Para executar a amostragem e recolha deve-se:

- Avaliar visualmente o estado da torneira escolhida como ponto de amostragem. A recolha não deve ser efetuada em torneira que apresente fissuras;
- Efetuar a recolha em torneiras que não possuam acessórios de mistura, preferencialmente;
- Retirar (se possível) os acessórios externos e adaptados à torneira (mangueiras, filtros ou outras aplicações);

- Caso a torneira apresente sujidade, esta deverá ser limpa antes de se efetuar a respetiva recolha;
- De seguida, abrir e fechar a torneira várias vezes de forma a proceder à eliminação da sujidade existente na torneira;
- Desinfetar a torneira, preferencialmente por flamejamento, com utilização de um maçarico (Figura 6);
- No caso de não ser possível retirar os acessórios da torneira, esta deve ser desinfetada com algodão embebido em álcool a 70 % e mergulhada a boca da mesma em álcool a 70 % durante dois a três minutos (Figura 6);
- Abrir a torneira, deixar escoar com fluxo máximo, até ouvir um barulho crepitante;
- De seguida, reduzir o fluxo e deixar correr a água o tempo suficiente para eliminar a influência do desinfetante e/ou da temperatura de flamejamento, e até que a temperatura da água atinja uma temperatura constante;
- Sem fechar a torneira, recolher, a mostra inclinando o frasco para baixo e segurando-o pela base, de forma a não tocar com as mãos no interior da tampa, nem no gargalo - A recolha deve ser sempre efetuada em condições de assepsia;
- Homogeneizar a amostra após efetuar a recolha;
- Utilizar um frasco adequado, ou seja, de igual capacidade à amostra recolhida, para medição e registo da temperatura aquando da recolha e enviá-lo juntamente com a amostra;
- Efetuar a leitura da temperatura à chegada ao laboratório e o seu respetivo registo.

Todas as amostras devem ser enviadas devidamente identificadas:

- Nome/número do requisitante;
- Ponto de amostragem e parâmetros a analisar;
- Data, hora, lote da garrafa e temperatura da colheita e temperatura à chegada;
- Identificação do técnico responsável pela colheita;
- Fazer-se acompanhar pela respetiva Guia de Recolha de Amostra.

As amostras devem ser enviadas em malas térmicas, limpas e com acumuladores de frio, de modo a garantir que a temperatura das amostras aquando da receção no laboratório é igual ou inferior à temperatura registada aquando da sua colheita. No caso de transportes inferiores a oito horas, usam-se termómetros digitais; para transportes superiores a oito horas usam-se dataloggers[52].

No caso de colheitas de água como é distribuída até à torneira, se não houver necessidade de desinfeção não se torna necessário realizar a purga [34] [50].

De forma, a se determinar a qualidade da água tal como é consumida (como por exemplo, exemplo em situações de surto), contaminações provenientes da parte exterior ou interior da torneira devem ser tidas em conta. Portanto antes de se efetuar a recolha, os acessórios da torneira não devem ser retirados, a torneira não deve ser desinfetada, não se deve efetuar purga, nem se deve efetuar a leitura da temperatura [34,50].



**Figura 6** - Desinfecção da torneira

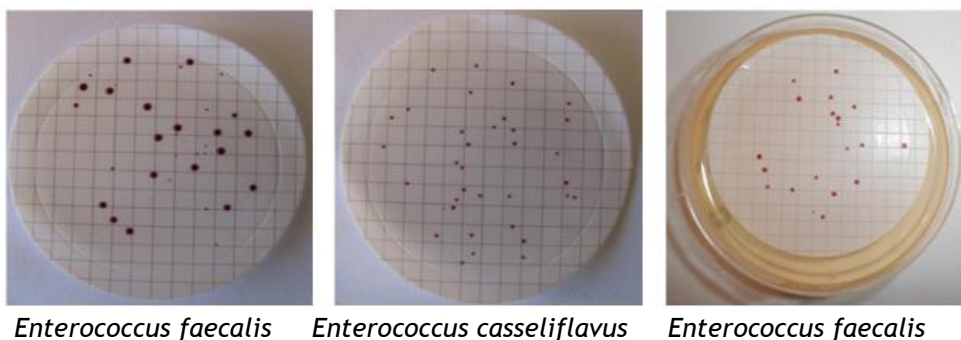
### 3.5. Métodos normalizados

A Labinter efetua as análises tendo como base as normas internacionais (ISO) em vigor, recomendação IRAR N.º05/2005 que é a base do Método Interno (MI), e normas da Environment Agency (EA) todos os meios de cultura utilizados são fornecidos pela Biogerm, Portugal [53].

#### 3.5.1. Método para pesquisa e quantificação de *Enterococcus* - ISO 7899-2:2000 [38]

- O meio de cultura para a pesquisa e quantificação de *Enterococcus* é o meio Slanetz and Bartley;
- Filtrar 100 mL da amostra (ou um volume mais elevado no caso de amostras engarrafadas, exemplo, 250 mL);
- Colocar o filtro da membrana na placa de petri contendo o meio Slanetz and Bartley;
- Incubar as placas na estufa a  $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  durante  $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$ ;

Após o período de incubação, verificar a existência de colónias típicas. As colónias típicas apresentam uma coloração vermelha, vermelho-escuro ou cor-de-rosa escuro, quer seja no centro ou em toda a sua totalidade (Figura 7);



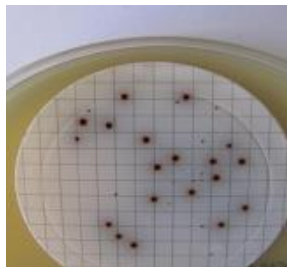
**Figura 7** - Colónias de *Enterococcus* características em meio de cultura Slanetz and Bartley [54].

No caso, de se observarem colónias características procede-se ao teste de confirmação:

- O meio de cultura para confirmação de colónias suspeita de *Enterococcus* é o Bile-aesculin-agar (BEA);
- Com recurso a uma pinça estéril transferir a membrana, sem a inverter, para uma placa de petri contendo o meio bile-aesculin-agar previamente aquecida a  $44\text{ °C}$ ;
- Incubar a placa a  $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  por um período de 2h;

- Efectuar a leitura imediatamente;

Todas as colónias características apresentam uma coloração negra circundante, o que indica uma reacção positiva, por conseguinte a existência de *Enterococcus faecalis* (Figura 8).



**Figura 8** - Colónias típicas de *Enterococcus* em meio de cultura BEA [54].

### 3.5.2. Enumeração de microrganismos viáveis - número de colónias a 22 °C e 37 °C - ISO 6222:1999 [37]

- O meio de cultura para enumeração de microrganismos viáveis a 22 °C e 37 °C é o meio de cultura yeast extract agar;
- Caso seja necessário, efectuar as respectivas diluições, em conformidade com as normas ISO 6887-1 [55];
- Colocar 1 mL da amostra e/ou das respectivas diluições em caixas de petri estéreis de 90 mm;
- Adicionar o meio de cultura adequado à amostra e homogeneizar muito lentamente;
- Inocular pelo menos uma placa de petri para cada temperatura de incubação (22 °C e 37 °C);
- Inverter as placas e colocá-las a 36 °C ± 2 °C por um período de 44h ± 4h e 22 °C ± 2 °C por um período de 68h ± 4h;
- Após o período de incubação analisar as placas de petri;
- Rejeitar as placas que não possuam um crescimento confluyente;
- Para cada temperatura, contar as colónias existentes em cada placa e calcular o número estimado de ufc que se encontram presentes em 1 mL da amostra.

### 3.5.3. Método para pesquisa e quantificação de *Clostridium perfringens* - EA - Parte 6, Método B, The Microbiology of Drinking Water (2010)

O método é adequado para a maioria dos tipos de amostras, com excepção para amostras muito túrbidas. Tal facto pode limitar o volume de amostra filtrado, e o depósito acumulado

sobre o filtro pode mascarar ou inibir o crescimento. O número máximo de colónias que se devem contar a partir de uma única membrana é de aproximadamente 100.

Os volumes e as diluições (caso seja aplicável) devem ser escolhidos de forma, a que se contem, entre 20 a 80 colónias por membrana filtrante.

Para águas de consumo humano ou águas tratadas filtrar 100 mL da amostra através de uma membrana filtrante;

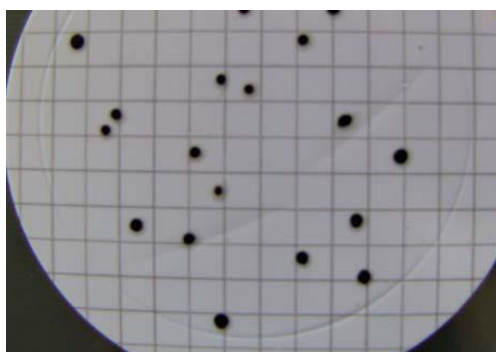
Após a filtração, remove-se a membrana filtrante com uma pinça esterilizada e coloca-se numa placa de petri contendo o meio TSC agar, assegurando que não ficam bolhas de ar por baixo da membrana;

Incubar as placas em anaerobiose ou em outras condições que assegurem a anaerobiose, a  $44 \pm 1$  °C;

O tempo entre o início do ensaio e a incubação da membrana nunca deve ser superior a 2 horas;

As placas são incubadas em anaerobiose por um período de  $(21 \pm 3)$  h;

Em condições anaeróbias e a 44 °C as colónias de *Clostridium* são tipicamente pretas ou cinzentas, no entanto em algumas ocasiões podem-se encontrar colónias incolores. Desta forma, todas as colónias que crescem em TSC a 44 °C devem ser consideradas como colónias presumíveis de *Clostridium perfringens* (Figura 9);



**Figura 9** - Colónias típicas de *Clostridium perfringens* [37]

Caso o número de colónias presentes seja inferior a 10, estas devem ser todas repicadas para o meio Columbia 5%; em situações em que o número de colónias presentes na membrana filtrante seja superior ou igual a 10 colónias, devem ser seleccionadas 10 colónias e repicadas para o meio colúmbia 5%;

Repicar as colónias existentes em TSC agar para duas placas de colúmbia 5 %, sendo uma das placas incubada em anaerobiose e outra em aerobiose. Ambas são incubadas a  $36 \pm 2$  °C por um período de  $21 \pm 3$  h;

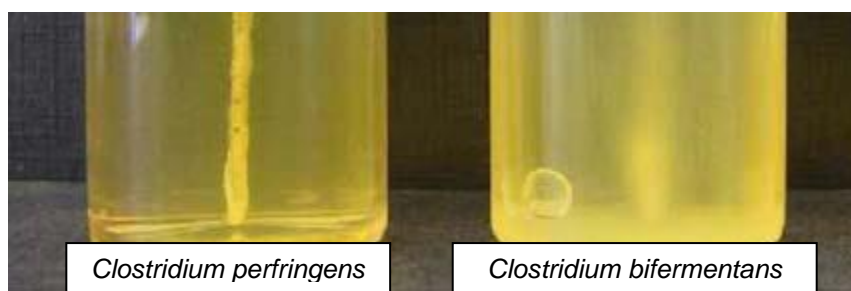
Findo o tempo de incubação examinar a presença ou ausência de crescimento e a sua pureza;

Os testes de confirmação só devem ser efectuados a partir de colónias que cresceram em condições de anaerobiose. Colónias características de *Clostridium perfringens* produzem hemólise em Colúmbia 5 %;

De seguida, procede-se aos testes de confirmação:

#### Buffered Nitrate-Motility:

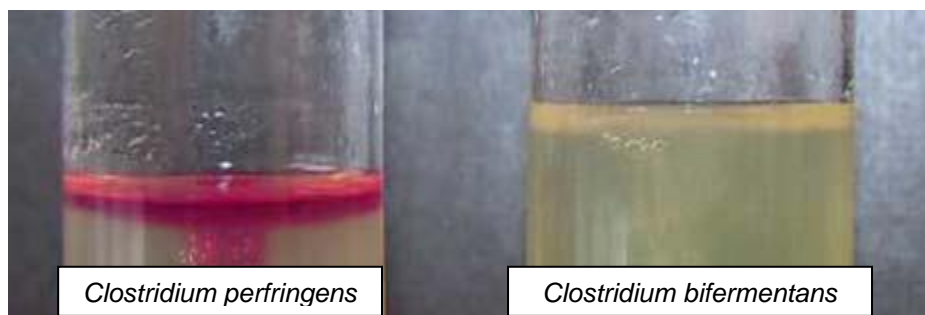
- Antes de se utilizar o meio de cultura, os tubos devem ser aquecidos em água fervente por um período de 10 - 15 minutos, por forma a se assegurar a eliminação de oxigénio;
- De seguida, os tubos devem ser arrefecidos em banho de gelo, por forma a solidificarem e ficarem prontos a utilizar;
- Para cada um dos isolados, deve-se inocular um tundo de Buffered Nitrate-Motility - deixar cair a ansa no tubo de forma a cortar o meio;
- Incubar a  $(36 \pm 2)$  °C por um período de  $(21 \pm 3)$  h em condições de anaerobiose;
- Findo o tempo de incubação examinar o tubo e verificar a existência de crescimento ao longo da linha (onde caiu a ansa) (Figura 10);



**Figura 10** - Teste da motilidade [37]

- Para testar a redução de nitratos, deve-se adicionar umas gotas do reagente A e B, cerca de 0,2 - 0,5 mL;
- Se após 15 minutos se verificar o desenvolvimento de uma coloração vermelha, verifica-se então a redução de nitrato a nitrito, e o teste é considerado positivo (Figura 11);

- Se ao fim de 15 minutos não houver desenvolvimento de uma coloração vermelha, adicionar uma pequena quantidade de zinco e esperar cerca de 10 minutos;
- No caso de aparecer uma coloração vermelha após adição de zinco o nitrato não foi reduzido pelo que o teste é considerado negativo;
- Se após a adição de zinco não houver desenvolvimento de uma coloração vermelha a reacção indica que o nitrato foi reduzido a nitrito pelo que o teste é positivo.



**Figura 11** - Teste de redução de nitrato a nitrito [37]

#### Lactose Gelatine:

- Antes de se utilizar o meio de cultura, os tubos devem ser aquecidos em água fervente por um período de 10 - 15 minutos, por forma a se assegurar a eliminação de oxigénio;
- De seguida, os tubos devem ser arrefecidos em banho de gelo, por forma a solidificarem e ficarem prontos a utilizar;
- Para cada um dos isolados, deve-se inocular um tubo Lactose Gelatina;
- Os tubos devem ser incubados em condições anaeróbicas a 37 °C por um período de 44 ± 4 h - após a incubação o meio estará líquido;
- A fim de se determinar se ocorreu liquefacção da gelatina, o tubo deve ser colocado no frigorífico durante pelo menos 1 h - a liquefacção ocorre em tubos onde o meio de cultura permanece líquido após refrigeração;
- Caso seja necessário, os tubos podem ser verificados ao fim de 21 ± 3 h e refrigerados por um período de pelo menos 1 h.

Se nestas condições o meio se encontrar líquido (liquefacção da gelatina) o teste é considerado positivo e os resultados são anotados;

Se nestas condições o meio se encontrar sólido os tubos devem ser re-incubados a 37 °C em condições de anaerobiose, até perfazer o tempo de 44 ± 4 h.

Findo o tempo os tubos são examinados novamente.

A presença de *Clostridium perfringens* é confirmada através das seguintes reacções:

Buffered Nitrate-Motility:

- Não-móveis - crescimento somente ao longo da linha de golpe e não através do meio de cultura;
- Redução de nitrato - desenvolvimento de uma coloração vermelha após adição do reagente A e B ou permanecer incolor após a adição de zinco;

Lactose Gelatine:

- Fermentação da lactose - coloração laranja/amarelo do meio de cultura Lactose Gelatine;
- Liquefacção da gelatina - meio de cultura inoculado fica liquefeito.

### 3.6. Métodos não normalizados

#### 3.6.1. Pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes e *Echerichia Coli* - Método de filtração por membrana

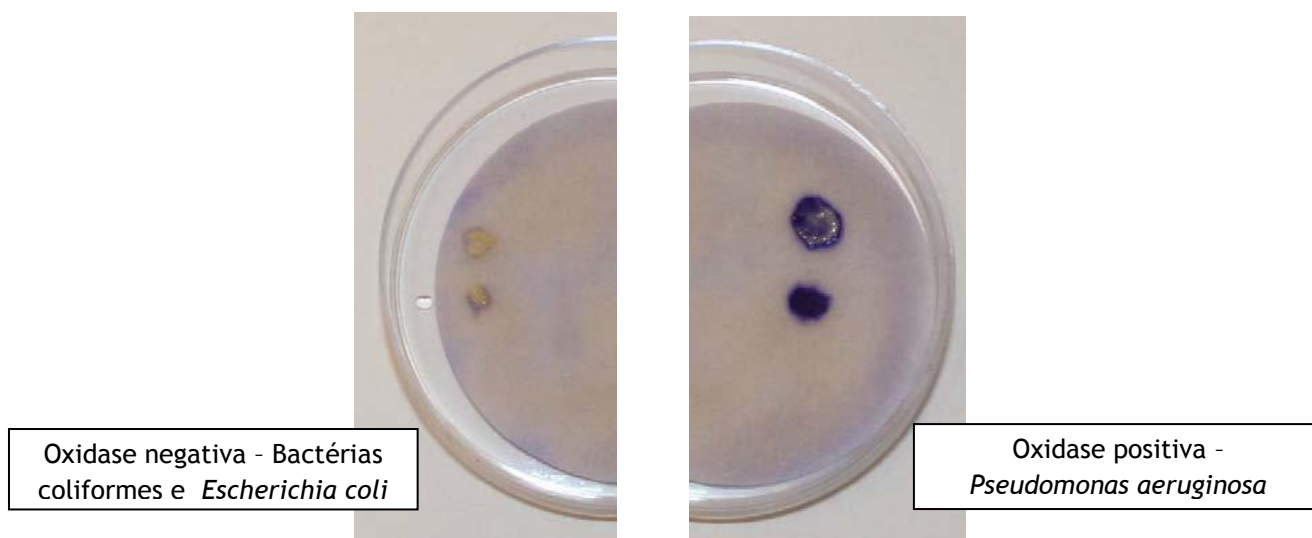
Método Interno baseado na recomendação IRAR n.º 05/2005 [53].

- O meio de cultura para a pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes e *Escherichia coli* é o meio Gelosado de Lauril Sulfato (MLSA);
- Filtrar 100 mL da amostra (ou um volume mais elevado no caso de amostras engarrafadas, exemplo, 250 mL) a ser estudada através de uma membrana filtrante;
- Colocar a membrana filtrante no respectivo meio de isolamento (Meio Gelosado de Lauril sulfato), garantido que não fica ar por baixo da membrana;
- Incubar a placa a  $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  durante  $21\text{ h} \pm 3\text{ h}$ ;
- Observar as membranas e contar como bactérias lactose positiva todas as colónias características que mostrem um desenvolvimento de cor amarela ou laranja no meio por baixo da membrana (Figura 12);
- Para efectuar os testes oxidase e indol, proceder à subcultura de todas as colónias características obtidas, ou de um número representativo (pelo menos cinco de cada tipo) para meio gelosado não selectivo, tryptone soya agar (TSA);
- Incubar o TSA a  $(36,0 \pm 2,0)\text{ °C}$  e proceder ao teste oxidase (Figura 13). Considerar o aparecimento de cor azul-púrpura escuro em 30 segundos como teste positivo;
- As colónias oxidase negativa são consideradas como bactérias coliformes.;

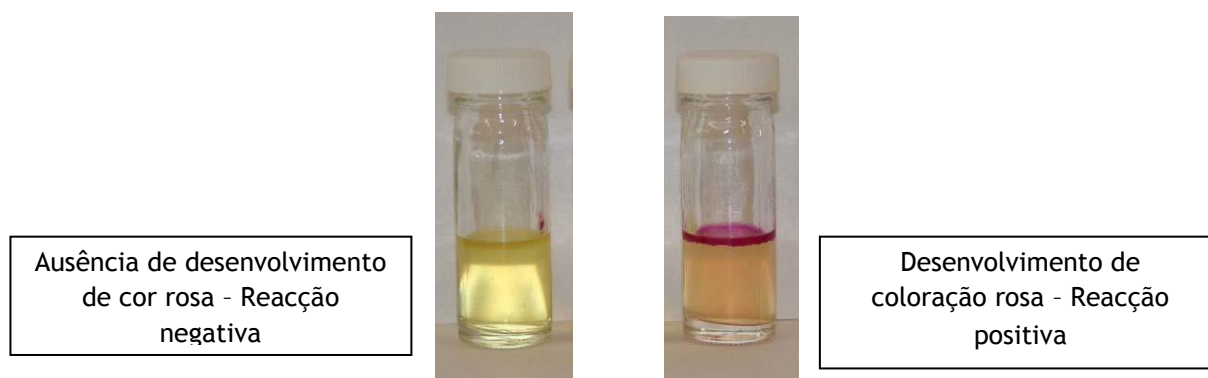
- Incubar em meio DEV-Fluorocult, todas as colónias oxidase negativa, à temperatura de  $(44,0 \pm 0,5)$  °C durante  $(21 \pm 3)$  h.
- Findo o tempo de incubação observar a fluorescência sob luz ultravioleta, e adicionar 0,2 a 0,3 mL de reagente Kovacs de forma a verificar a produção de indol (Figura 14);
- A observação de fluorescência e/ou o desenvolvimento de cor vermelho cereja à superfície do meio confirma a produção de indol;
- São consideradas todas as colónias que são oxidase negativa, lactose positiva e que apresentam fluorescência e/ou indol positivo como *Escherichia coli*;
- A partir do número de colónias características contadas na membrana filtrante e considerando os resultados dos testes de confirmação realizados, calcula-se o número de bactérias coliformes e de *Escherichia coli* presentes em 100 mL de amostra.



**Figura 12** - Colónias amarela, colonias presumíveis de Bactérias Coliformes / *Escherichia coli* [56]



**Figura 13** - Teste oxidase



**Figura 14** - Produção de Indol com adição do Reagente Kovac's

### a) Quantificação Coliformes e *E.coli*:

$$Cs = ( X \times V_{total} ) / Vs$$

Onde,

Cs = Contagem de colónias

X = Número estimado de colónias por placa

Vtotal = Volume total da amostra

Vs = Volume em que vai ser expresso o resultado

Com confirmação:

$$X = ( K / n ) \times Z$$

Onde,

X = Número de colónias confirmadas por placa

K = Número de colónias que cumprem com o critério de identificação ou confirmação

n = Número de colónias presumptivas que vão para confirmação

Z = Número total de colónias presumptivas contadas na placa de petri

Exemplo:

Total de Colónias Presumptivas = 91

5 Colónias confirmadas onde 3 cumprem com o critério de confirmação de *E.coli*.

$$X = (3 / 5) \times 91 = 54,6$$

$$Cs = (54,6 / 100) \times 100 = 55 \text{ Colónias}$$

Ou seja, 55 colónias são *E.coli*, e 91 são Coliformes Totais.

Para os restantes métodos de pesquisa e quantificação das bactérias estudadas os cálculos foram sempre efectuados de forma similar aos apresentados.

## **Capitulo 4 - Resultados e discussão**

## Capítulo 4 - Resultados e discussão

### 4.1. Validação e implementação dos métodos

A fim de confirmar que os métodos utilizados são adequados para o fim previsto, a Labinter realiza os seguintes ensaios:

#### 4.1.1. Experiência do método

Para se evidenciar a experiência do método, foram realizados 30 ensaios com amostras naturalmente contaminadas. Na ausência de amostras naturalmente contaminadas realizaram-se os ensaios com amostras artificialmente contaminadas, usando-se para tal MRC.

##### a) Pesquisa e quantificação de *Enterococcus*

**Tabela 5** - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de *Enterococcus*

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem	Confirmação
1	3-jan-14	86Q	38	38
2	6-jan-14	86Q	42	42
3	10-jan-14	86Q	12	12
4	13-jan-14	86Q	12	12
5	17-jan-14	86Q	22	22
6	20-jan-14	86Q	45	45
7	24-jan-14	88Q	25	25
8	27-jan-14	88Q	34	34
9	31-jan-14	88Q	12	12
10	3-fev-14	88Q	78	78
11	7-fev-14	89Q	74	74
12	10-fev-14	89Q	58	58
13	14-fev-14	89Q	34	34
14	17-fev-14	89Q	66	66
15	21-fev-14	91Q	69	69
16	24-fev-14	91Q	60	60
17	28-fev-14	91Q	66	66
18	3-mar-14	91Q	25	25
19	7-mar-14	93Q	21	21
20	10-mar-14	93Q	54	54
21	14-mar-14	93Q	18	18

**Tabela 5** - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de *Enterococcus* (Continuação)

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem	Confirmação
22	17-mar-14	93Q	23	23
23	21-mar-14	93Q	35	35
24	24-mar-14	93Q	11	11
25	28-mar-14	96Q	26	26
26	31-mar-14	96Q	24	24
27	04-abr-14	96Q	23	23
28	7-abr-14	96Q	48	48
29	11-abr-14	96Q	56	56
30	15-abr-14	98Q	27	27

**b) Contagem de microrganismos a 22 °C**

**Tabela 6** - Resultados obtidos para a experiência do método - Contagem de microrganismos a 22 °C

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem
1	3-jan-14	79V	23
2	6-jan-14	79V	32
3	10-jan-14	79V	22
4	13-jan-14	79V	73
5	17-jan-14	79V	52
6	20-jan-14	79V	44
7	24-jan-14	79V	83
8	27-jan-14	79V	40
9	31-jan-14	79V	81
10	3-fev-14	79V	67
11	7-fev-14	85V	52
12	10-fev-14	85V	89
13	14-fev-14	85V	110
14	17-fev-14	85V	100
15	21-fev-14	85V	196
16	24-fev-14	85V	168
17	28-fev-14	85V	155
18	3-mar-14	85V	183
19	7-mar-14	97V	201
20	10-mar-14	97V	137

**Tabela 6** - Resultados obtidos para a experiência do método - Contagem de microrganismos a 22 °C (Continuação)

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem
21	14-mar-14	97V	62
22	17-mar-14	97V	44
23	21-mar-14	97V	48
24	24-mar-14	04W	60
25	28-mar-14	04W	101
26	31-mar-14	04W	30
27	04-abr-14	04W	25
28	7-abr-14	04W	51
29	11-abr-14	04W	47
30	15-abr-14	04W	123

## c) Contagem de microrganismos a 37 °C

**Tabela 7** - Resultados obtidos para a experiência do método - Contagem de microrganismos a 37 °C

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem
1	3-jan-14	79V	21
2	6-jan-14	79V	27
3	10-jan-14	79V	39
4	13-jan-14	79V	83
5	17-jan-14	79V	101
6	20-jan-14	79V	37
7	24-jan-14	79V	65
8	27-jan-14	79V	33
9	31-jan-14	79V	45
10	3-fev-14	79V	53
11	7-fev-14	85V	53
12	10-fev-14	85V	73
13	14-fev-14	85V	70
14	17-fev-14	85V	50
15	21-fev-14	85V	55
16	24-fev-14	85V	51
17	28-fev-14	85V	40
18	3-mar-14	85V	27
19	7-mar-14	97V	27

**Tabela 7** - Resultados obtidos para a experiência do método - Contagem de microrganismos a 37 °C (Continuação)

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem
20	10-mar-14	97V	30
21	14-mar-14	97V	64
22	17-mar-14	97V	214
23	21-mar-14	97V	208
24	24-mar-14	04W	51
25	28-mar-14	04W	54
26	31-mar-14	04W	74
27	04-abr-14	04W	56
28	7-abr-14	04W	88
29	11-abr-14	04W	99
30	15-abr-14	04W	82

#### d) Pesquisa e quantificação de *Clostridium perfringens*

**Tabela 8** - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de *Clostridium perfringens*

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem	Confirmação
1	3-jan-14	25T	34	34
2	6-jan-14	25T	17	17
3	10-jan-14	29T	20	20
4	13-jan-14	29T	28	28
5	17-jan-14	29T	18	18
6	20-jan-14	29T	23	23
7	24-jan-14	32T	39	39
8	27-jan-14	32T	15	15
9	31-jan-14	35T	22	22
10	3-fev-14	35T	17	17
11	7-fev-14	38T	20	20
12	10-fev-14	38T	14	14
13	14-fev-14	38T	44	44
14	17-fev-14	40T	39	39
15	21-fev-14	40T	33	33
16	24-fev-14	44T	21	21
17	28-fev-14	44T	28	28
18	3-mar-14	47T	22	22

**Tabela 8** - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de *Clostridium perfringens* (Continuação)

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem	Confirmação
19	7-mar-14	47T	50	50
20	10-mar-14	50T	61	61
21	14-mar-14	50T	29	29
22	17-mar-14	55T	63	63
23	21-mar-14	55T	22	22
24	24-mar-14	55T	15	15
25	28-mar-14	62T	20	20
26	31-mar-14	62T	20	20
27	04-abr-14	62T	34	34
28	7-abr-14	62T	26	26
29	11-abr-14	65T	38	38
30	15-abr-14	65T	25	25

#### e) Pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes

**Tabela 9** - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de Bactérias Coliformes

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem	Confirmação
1	3-jan-14	95°	17	17
2	6-jan-14	95°	22	22
3	10-jan-14	95°	33	33
4	13-jan-14	95°	29	29
5	17-jan-14	95°	42	42
6	20-jan-14	95°	25	25
7	24-jan-14	98°	33	33
8	27-jan-14	98°	44	44
9	31-jan-14	98°	12	12
10	3-fev-14	98°	58	58
11	7-fev-14	01P	33	33
12	10-fev-14	01P	53	53
13	14-fev-14	01P	48	48
14	17-fev-14	01P	35	35
15	21-fev-14	01P	55	55
16	24-fev-14	01P	34	34
17	28-fev-14	01P	19	19

**Tabela 9** - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de Bactérias Coliformes (continuação)

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem	Confirmação
18	3-mar-14	01P	10	10
19	7-mar-14	05P	35	35
20	10-mar-14	05P	33	33
21	14-mar-14	05P	28	28
22	17-mar-14	05P	40	40
23	21-mar-14	05P	14	14
24	24-mar-14	05P	27	27
25	28-mar-14	05P	12	12
26	31-mar-14	05P	13	13
27	04-abr-14	08P	6	6
28	7-abr-14	08P	17	17
29	11-abr-14	08P	33	33
30	15-abr-14	12P	11	11

#### f) Pesquisa e quantificação de *Escherichia Coli*

**Tabela 10** - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de *Escherichia coli*

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem	Confirmação
1	3-jan-14	95°	14	14
2	6-jan-14	95°	32	32
3	10-jan-14	95°	53	53
4	13-jan-14	95°	10	10
5	17-jan-14	95°	12	12
6	20-jan-14	95°	10	10
7	24-jan-14	98°	13	13
8	27-jan-14	98°	26	26
9	31-jan-14	98°	17	17
10	3-fev-14	98°	25	25
11	7-fev-14	01P	10	10
12	10-fev-14	01P	26	26
13	14-fev-14	01P	20	20
14	17-fev-14	01P	5	5
15	21-fev-14	01P	35	35
16	24-fev-14	01P	26	26

**Tabela 10** - Resultados obtidos para a experiência do método - Pesquisa e Quantificação de *Escherichia coli* (continuação)

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem	Confirmação
17	28-fev-14	01P	21	21
18	3-mar-14	01P	10	10
19	7-mar-14	05P	21	21
20	10-mar-14	05P	22	22
21	14-mar-14	05P	34	34
22	17-mar-14	05P	19	19
23	21-mar-14	05P	10	10
24	24-mar-14	05P	28	28
25	28-mar-14	05P	33	33
26	31-mar-14	05P	11	11
27	04-abr-14	08P	40	40
28	7-abr-14	08P	44	44
29	11-abr-14	08P	11	11
30	15-abr-14	12P	22	18

Para cumprir os requisitos 5.2 e 5.4 da Norma NP EN ISO/IEC 17025 definiu-se a realização de 30 ensaios, com pelo menos 10 positivos para os parâmetros de pesquisa e quantificação. A realização destes 30 ensaios para cada método, foram realizados conforme se encontra descrito no capítulo 3, secção 3.5 e 3.6, e foram supervisionados por um técnico qualificado e com experiência. Desta forma, garantiu-se a veracidade dos resultados apresentados (Tabela 5 à Tabela 10).

#### 4.1.2. Carta de duplicados

Para a determinação do critério de precisão (CP), foram executados pelo mesmo operador 20 ensaios em duplicado. Desta forma foram avaliados a repetibilidade e a precisão intermédia. Estes foram preferencialmente efectuados com amostras de água naturalmente contaminada, mas na sua inexistência recorreu-se a MRC da respectiva estirpe (amostras artificialmente contaminadas).

Todos os resultados que se apresentam foram tratados em folha de excell e de acordo com o descrito no Capítulo 3, secção 3.3.1, alínea a).

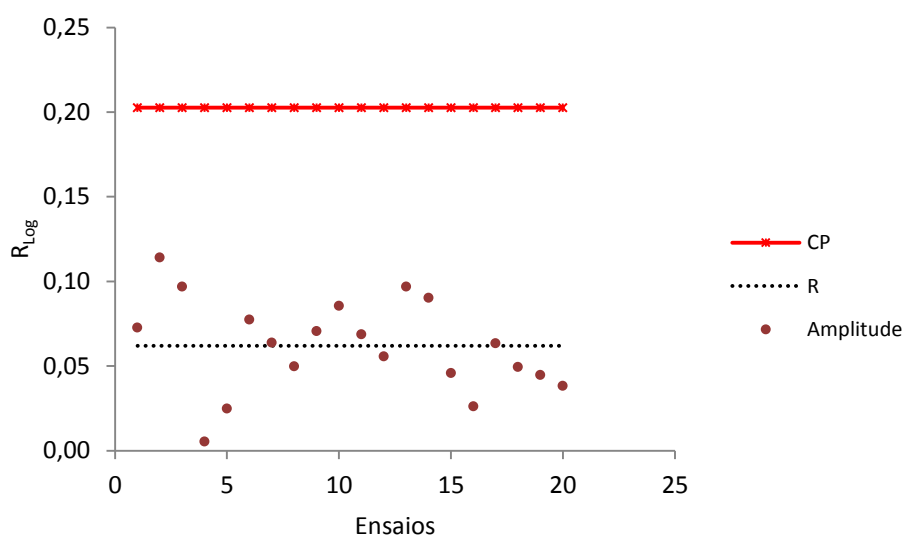
##### a) Pesquisa e quantificação de *Enterococcus*

**Tabela 11** - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Pesquisa e Quantificação de *Enterococcus*

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem (D1)	Contagem (D2)	Log(D1)	Log(D2)	R <sub>log</sub>
1	3-jan-14	86Q	11	13	1,04	1,11	0,07
2	6-jan-14	86Q	13	10	1,11	1,00	0,11
3	10-jan-14	86Q	15	12	1,18	1,08	0,10
4	13-jan-14	86Q	82	81	1,91	1,91	0,01
5	17-jan-14	86Q	36	34	1,56	1,53	0,02
6	20-jan-14	86Q	49	41	1,69	1,61	0,08
7	24-jan-14	88Q	19	22	1,28	1,34	0,06
8	27-jan-14	88Q	33	37	1,52	1,57	0,05
9	31-jan-14	88Q	17	20	1,23	1,30	0,07
10	3-fev-14	88Q	23	28	1,36	1,45	0,09
11	7-fev-14	89Q	35	41	1,54	1,61	0,07
12	10-fev-14	89Q	44	50	1,64	1,70	0,06
13	14-fev-14	89Q	28	35	1,45	1,54	0,10
14	17-fev-14	89Q	48	39	1,68	1,59	0,09
15	21-fev-14	91Q	30	27	1,48	1,43	0,05
16	24-fev-14	91Q	145	154	2,16	2,19	0,03
17	28-fev-14	91Q	162	140	2,21	2,15	0,06
18	3-mar-14	91Q	133	149	2,12	2,17	0,05
19	7-mar-14	93Q	111	123	2,05	2,09	0,04
20	10-mar-14	93Q	98	107	1,99	2,03	0,04

Tabela 12 - Determinação da média das amplitudes e CP - *Enterococcus*

<b>LIMITES</b>	
Média das Amplitudes $\bar{R}$	0,06
Critério de Precisão	0,20
Critério de Precisão ( 2013)	0,13
LSC	0,20
LIC	0,00



**Figura 15** - Amplitudes dos duplicados obtidos - Pesquisa e Quantificação de *Enterococcus*

Através da análise da Tabela 12, verifica-se que o CP do ano transacto é inferior ao obtido. Tal explica-se, pelo facto de o número de ensaios realizados tidos em conta para o cálculo do CP serem bastante inferiores ao do ano anterior. Um outro factor que contribuiu para o aumento deste valor, foi o incremento do número de amostras naturalmente contaminadas *versus* amostras artificialmente contaminadas, ou seja, recorreu-se preferencialmente a águas de consumo humano não tratadas (águas de furo), visto tratarem-se do mesmo tipo de matriz.

Na figura 15, a linha central (R) corresponde à média das amplitudes; a linha superior representada a vermelho corresponde ao critério de precisão (CP). Pela análise do gráfico concluiu-se que os resultados obtidos são bastante satisfatórios, uma vez que nenhuma das amplitudes ultrapassa o CP.

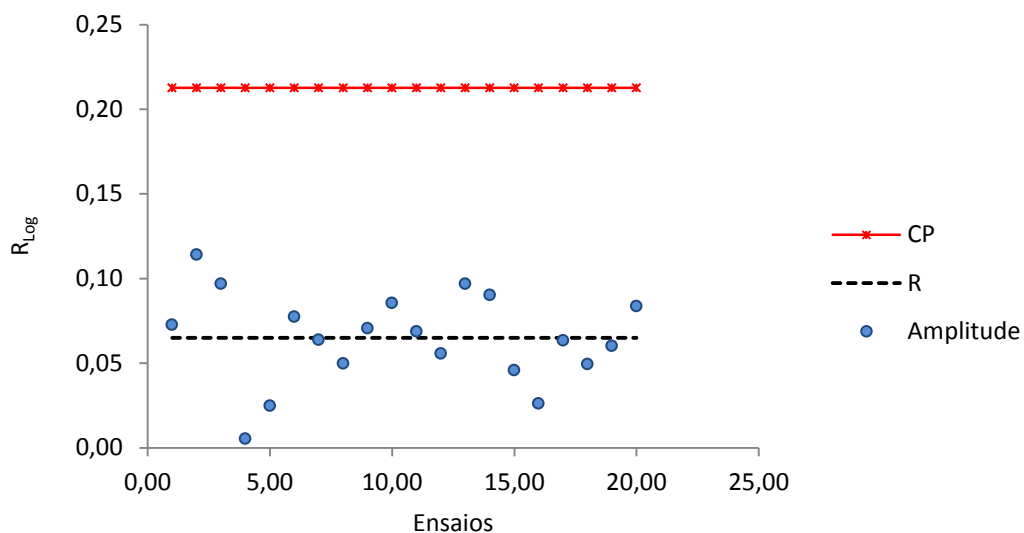
## b) Contagem de microrganismos a 22 °C

**Tabela 13** - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Contagem de Microrganismos a 22°C

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem (D1)	Contagem (D2)	Log(D1)	Log(D2)	R <sub>log</sub>
1	3-jan-14	79V	11	13	1,04	1,11	0,07
2	6-jan-14	79V	13	10	1,11	1,00	0,11
3	10-jan-14	79V	15	12	1,18	1,08	0,10
4	13-jan-14	79V	82	81	1,91	1,91	0,01
5	17-jan-14	79V	36	34	1,56	1,53	0,02
6	20-jan-14	79V	49	41	1,69	1,61	0,08
7	24-jan-14	79V	19	22	1,28	1,34	0,06
8	27-jan-14	79V	33	37	1,52	1,57	0,05
9	31-jan-14	79V	17	20	1,23	1,30	0,07
10	3-fev-14	79V	23	28	1,36	1,45	0,09
11	7-fev-14	85V	35	41	1,54	1,61	0,07
12	10-fev-14	85V	44	50	1,64	1,70	0,06
13	14-fev-14	85V	28	35	1,45	1,54	0,10
14	17-fev-14	85V	48	39	1,68	1,59	0,09
15	21-fev-14	85V	30	27	1,48	1,43	0,05
16	24-fev-14	85V	145	154	2,16	2,19	0,03
17	28-fev-14	85V	162	140	2,21	2,15	0,06
18	3-mar-14	85V	133	149	2,12	2,17	0,05
19	7-mar-14	97V	201	175	2,30	2,24	0,06
20	10-mar-14	97V	137	113	2,13	2,05	0,08

**Tabela 14** - Determinação da média das amplitudes e CP - Microrganismos a 22°C

<b>LIMITES</b>	
Média das Amplitudes $\bar{R}$	0,07
Crítério de Precisão	0,21
Crítério de Precisão ( 2013)	0,09
LSC	0,21
LIC	0,00



**Figura 16** - Amplitudes dos duplicados obtidos - Microrganismos a 22°C

Através da análise da Tabela 14, verifica-se que o CP do ano transacto é inferior ao obtido. Tal explica-se, pelo facto de o número de ensaios realizados tidos em conta para o cálculo do CP serem bastante inferiores ao do ano anterior e por se terem utilizado preferencialmente amostras naturalmente contaminadas. Os resultados obtidos foram considerados bastante precisos uma vez que se encontram pouco dispersos relativamente à média das amplitudes.

Na figura 16, a linha central (R) corresponde à média das amplitudes; a linha superior representada a vermelho corresponde ao critério de precisão (CP). Pela análise do gráfico concluiu-se que os resultados obtidos são bastante satisfatórios, uma vez que as amplitudes se encontram bastante próximas da média, por conseguinte afastadas da linha do CP.

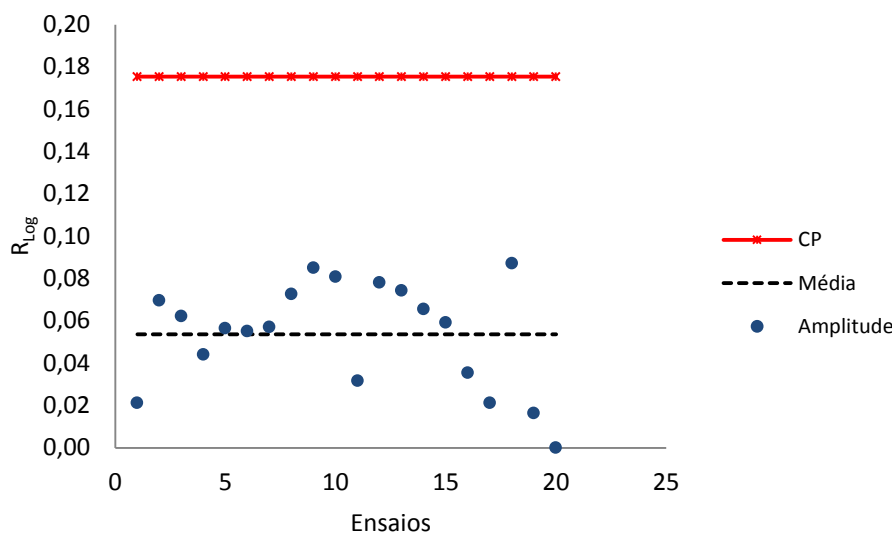
## c) Contagem de microrganismos a 37 °C

Tabela 15 - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Contagem de Microrganismos a 37 °C

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem (D1)	Contagem (D2)	Log(D1)	Log(D2)	R <sub>log</sub>
1	3-jan-14	79V	21	20	1,32	1,30	0,02
2	6-jan-14	79V	27	23	1,43	1,36	0,07
3	10-jan-14	79V	39	45	1,59	1,65	0,06
4	13-jan-14	79V	83	75	1,92	1,88	0,04
5	17-jan-14	79V	101	115	2,00	2,06	0,06
6	20-jan-14	79V	37	42	1,57	1,62	0,06
7	24-jan-14	79V	65	57	1,81	1,76	0,06
8	27-jan-14	79V	33	39	1,52	1,59	0,07
9	31-jan-14	79V	45	37	1,65	1,57	0,09
10	3-fev-14	79V	53	44	1,72	1,64	0,08
11	7-fev-14	85V	53	57	1,72	1,76	0,03
12	10-fev-14	85V	73	61	1,86	1,79	0,08
13	14-fev-14	85V	70	59	1,85	1,77	0,07
14	17-fev-14	85V	50	43	1,70	1,63	0,07
15	21-fev-14	85V	55	48	1,74	1,68	0,06
16	24-fev-14	85V	51	47	1,71	1,67	0,04
17	28-fev-14	85V	40	42	1,60	1,62	0,02
18	3-mar-14	85V	27	33	1,43	1,52	0,09
19	7-mar-14	97V	27	26	1,43	1,41	0,02
20	10-mar-14	97V	30	30	1,48	1,48	0,00

Tabela 16 - Determinação da média das amplitudes e CP - Microrganismos a 37 °C

<b>LIMITES</b>	
Média das Amplitudes $\bar{R}$	0,05
Crítério de Precisão	0,18
Crítério de Precisão ( 2013)	0,03
LSC	0,18
LIC	0,00



**Figura 17** - Amplitudes dos duplicados obtidos - Microrganismos a 37 °C

Através da análise da Tabela 16, verifica-se que o CP do ano transacto é inferior ao obtido. Tal explica-se, pelo facto de o número de ensaios realizados tidos em conta para o cálculo do CP serem bastante inferiores ao do ano anterior e por se terem utilizado preferencialmente amostras naturalmente contaminadas. Os resultados obtidos foram considerados bastante precisos uma vez que se encontram pouco dispersos relativamente à média das amplitudes.

Na figura 17, a linha central (R) corresponde à média das amplitudes; a linha superior representada a vermelho corresponde ao critério de precisão (CP). Pela análise do gráfico concluiu-se que os resultados obtidos são bastante satisfatórios, uma vez que as amplitudes se encontram bastante próximas da média, por conseguinte afastadas da linha do CP.

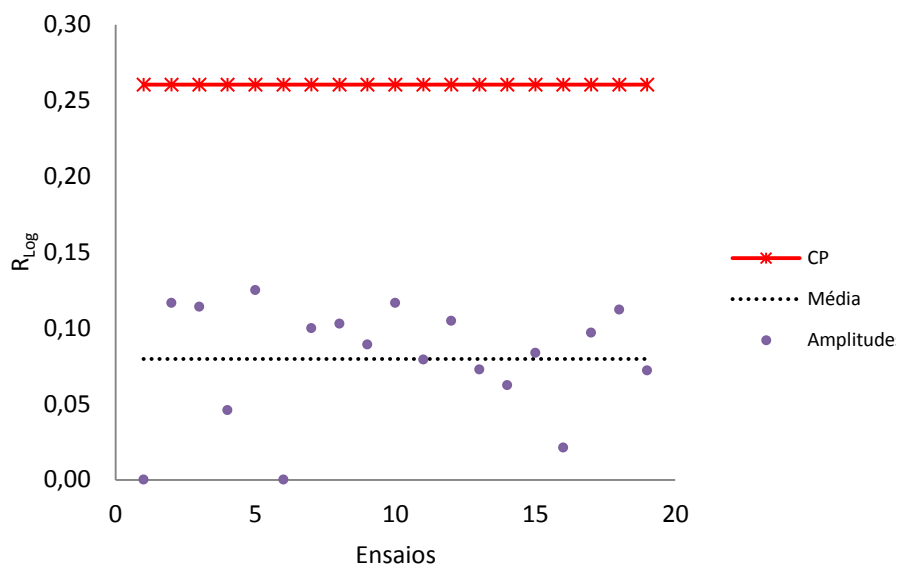
#### d) Pesquisa e quantificação de *Clostridium perfringens*

**Tabela 17** - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Pesquisa e Quantificação de *Clostridium perfringens*

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem (D1)	Contagem (D2)	Log(D1)	Log(D2)	R <sub>log</sub>
1	3-jan-14	25T	23	23	1,36	1,36	0,00
2	6-jan-14	25T	17	13	1,23	1,11	0,12
3	10-jan-14	29T	20	26	1,30	1,41	0,11
4	13-jan-14	29T	18	20	1,26	1,30	0,05
5	17-jan-14	29T	18	24	1,26	1,38	0,12
6	20-jan-14	29T	23	23	1,36	1,36	0,00
7	24-jan-14	32T	39	31	1,59	1,49	0,10
8	27-jan-14	32T	15	19	1,18	1,28	0,10
9	31-jan-14	35T	22	27	1,34	1,43	0,09
10	3-fev-14	35T	17	13	1,23	1,11	0,12
11	7-fev-14	38T	20	24	1,30	1,38	0,08
12	10-fev-14	38T	14	11	1,15	1,04	0,10
13	14-fev-14	38T	44	52	1,64	1,72	0,07
14	17-fev-14	40T	39	45	1,59	1,65	0,06
15	21-fev-14	40T	33	40	1,52	1,60	0,08
16	24-fev-14	44T	21	20	1,32	1,30	0,02
17	28-fev-14	44T	28	35	1,45	1,54	0,10
18	3-mar-14	47T	22	17	1,34	1,23	0,11
19	7-mar-14	47T	50	59	1,70	1,77	0,07
20	10-mar-14	50T	3	3	0,48	0,48	0,00

**Tabela 18** - Determinação da média das amplitudes e CP - *Clostridium perfringens*

<b>LIMITES</b>	
Média das Amplitudes $\bar{R}$	0,08
Crítério de Precisão	0,26
Crítério de Precisão ( 2013)	0,04
LSC	0,26
LIC	0,00



**Figura 18** - Amplitudes dos duplicados obtidos - *Clostridium perfringens*

Através da análise da Tabela 18, verifica-se que o CP do ano transacto é inferior ao obtido. Tal explica-se, pelo facto de o número de ensaios realizados tidos em conta para o cálculo do CP serem bastante inferiores ao do ano anterior e por se terem utilizado preferencialmente amostras naturalmente contaminadas. Os resultados obtidos foram considerados bastante precisos uma vez que se encontram pouco dispersos relativamente à média das amplitudes.

Na Figura 18, a linha central (R) corresponde à média das amplitudes; a linha superior representada a vermelho corresponde ao critério de precisão (CP). Pela análise do gráfico concluiu-se que os resultados obtidos são bastante satisfatórios, uma vez que as amplitudes se encontram bastante próximas da média, por conseguinte afastadas da linha do CP.

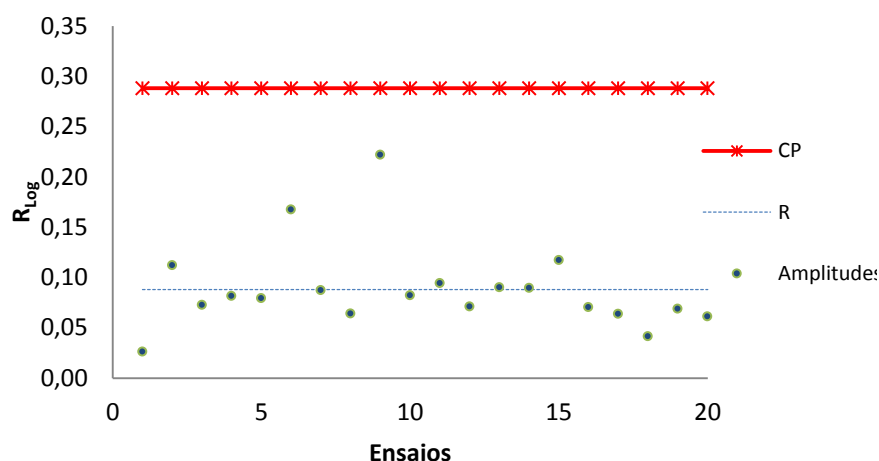
## e) Pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes

**Tabela 19** - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Pesquisa e Quantificação de Bactérias Coliformes

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem (D1)	Contagem (D2)	Log(D1)	Log(D2)	R <sub>log</sub>
1	3-jan-14	950	17	16	1,23	1,20	0,03
2	6-jan-14	950	22	17	1,34	1,23	0,11
3	10-jan-14	950	33	39	1,52	1,59	0,07
4	13-jan-14	950	29	35	1,46	1,54	0,08
5	17-jan-14	950	42	35	1,62	1,54	0,08
6	20-jan-14	950	25	17	1,40	1,23	0,17
7	24-jan-14	980	33	27	1,52	1,43	0,09
8	27-jan-14	980	44	51	1,64	1,71	0,06
9	31-jan-14	980	12	20	1,08	1,30	0,22
10	3-fev-14	980	58	48	1,76	1,68	0,08
11	7-fev-14	01P	33	41	1,52	1,61	0,09
12	10-fev-14	01P	53	45	1,72	1,65	0,07
13	14-fev-14	01P	48	39	1,68	1,59	0,09
14	17-fev-14	01P	35	43	1,54	1,63	0,09
15	21-fev-14	01P	55	42	1,74	1,62	0,12
16	24-fev-14	01P	34	40	1,53	1,60	0,07
17	28-fev-14	01P	19	22	1,28	1,34	0,06
18	3-mar-14	01P	10	11	1,00	1,04	0,04
19	7-mar-14	05P	35	41	1,54	1,61	0,07
20	10-mar-14	05P	33	38	1,52	1,58	0,06

**Tabela 20** - Determinação da média das amplitudes e CP - Bacterias Coliformes

<b>LIMITES</b>	
Média das Amplitudes $\bar{R}$	0,09
Critério de Precisão	0,29
Critério de Precisão ( 2013)	0,09
LSC	0,29
LIC	0,00



**Figura 19** - Amplitudes dos duplicados obtidos - Bactérias Coliformes

Através da análise da Tabela 20, verifica-se que o CP do ano transacto é inferior ao obtido. Tal explica-se, pelo facto de o número de ensaios realizados tidos em conta para o cálculo do CP serem bastante inferiores ao do ano anterior e por se terem utilizado preferencialmente amostras naturalmente contaminadas. Apesar de se terem obtido dois valores que se afastam ligeiramente da média

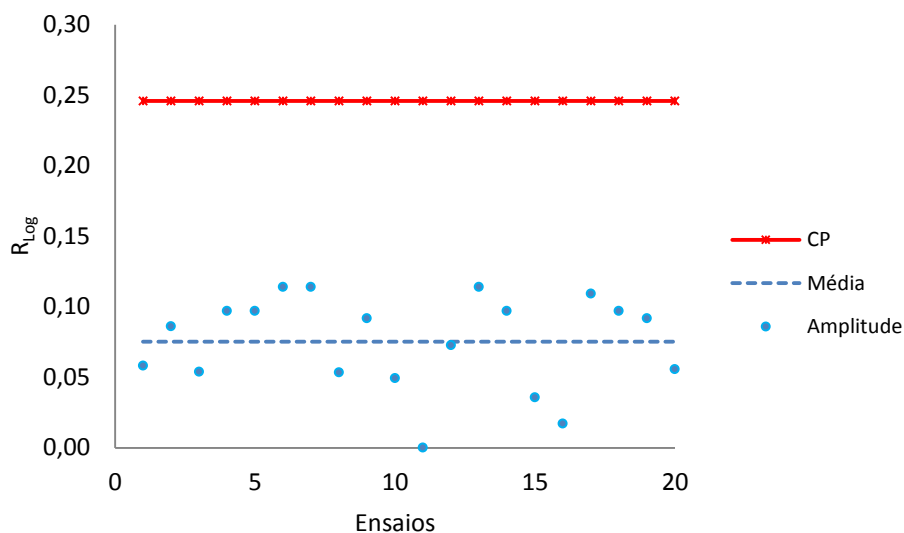
Na Figura 19, a linha central (R) corresponde à média das amplitudes; a linha superior representada a vermelho corresponde ao critério de precisão (CP). Pela análise do gráfico verifica-se que dois valores se afastam ligeiramente da média, no entanto não se considera este desvio significativo uma vez que se situam abaixo da linha de CP, pelo que se concluiu que os resultados obtidos são e satisfatórios.

f) Pesquisa e quantificação de *Escherichia Coli***Tabela 21** - Resultados obtidos para construção da carta de duplicados - Pesquisa e quantificação de *Escherichia coli*

Ensaio	Data	Lote do Meio	Contagem (D1)	Contagem (D2)	Log(D1)	Log(D2)	R <sub>log</sub>
1	3-jan-14	950	14	16	1,15	1,20	0,06
2	6-jan-14	950	32	39	1,51	1,59	0,09
3	10-jan-14	950	53	60	1,72	1,78	0,05
4	13-jan-14	950	10	8	1,00	0,90	0,10
5	17-jan-14	950	12	15	1,08	1,18	0,10
6	20-jan-14	950	10	13	1,00	1,11	0,11
7	24-jan-14	980	13	10	1,11	1,00	0,11
8	27-jan-14	980	26	23	1,41	1,36	0,05
9	31-jan-14	980	17	21	1,23	1,32	0,09
10	3-fev-14	980	25	28	1,40	1,45	0,05
11	7-fev-14	01P	10	10	1,00	1,00	0,00
12	10-fev-14	01P	26	22	1,41	1,34	0,07
13	14-fev-14	01P	20	26	1,30	1,41	0,11
14	17-fev-14	01P	15	14	1,18	1,15	0,03
15	21-fev-14	01P	35	38	1,54	1,58	0,04
16	24-fev-14	01P	26	25	1,41	1,40	0,02
17	28-fev-14	01P	21	27	1,32	1,43	0,11
18	3-mar-14	01P	20	18	1,30	1,26	0,10
19	7-mar-14	05P	21	17	1,32	1,23	0,09
20	10-mar-14	05P	22	25	1,34	1,40	0,06

**Tabela 22** - Determinação da média das amplitudes e CP - *Escherichia coli*

<b>LIMITES</b>	
Média das Amplitudes $\bar{R}$	0,07
Critério de Precisão	0,23
Critério de Precisão ( 2013)	0,12
LSC	0,23
LIC	0,00



**Figura 20** - Amplitudes dos duplicados obtidos - *Escherichia coli*

Através da análise da Tabela 22, verifica-se que o CP do ano transacto é inferior ao obtido. Tal explica-se, pelo facto de o número de ensaios realizados tidos em conta para o cálculo do CP serem bastante inferiores ao do ano anterior e por se terem utilizado preferencialmente amostras naturalmente contaminadas. Os resultados obtidos foram considerados bastante precisos uma vez que se encontram pouco dispersos relativamente à média das amplitudes.

Na Figura 20, a linha central (R) corresponde à média das amplitudes; a linha superior representada a vermelho corresponde ao critério de precisão (CP). Pela análise do gráfico concluiu-se que os resultados obtidos são bastante satisfatórios, uma vez que as amplitudes se encontram bastante próximas da média, por conseguinte afastadas da linha do CP.

### 4.1.3. Cálculo de incertezas

O desvio padrão da reprodutibilidade foi calculado para cada método quantitativo, como tal efectuaram-se 20 ensaios em paralelo ou seja por técnicos diferentes e em diferentes dias da semana, permitindo assim cobrir as variações das condições operativas. Os dados foram recolhidos ao longo de 3 meses e apenas foram considerados os resultados em que se obteve um número de unidades formadoras de colónias superior a 10.

Após a recolha de resultados foram tratados em folha de excell, conforme procedimento descrito no Capítulo 3.

#### a) Pesquisa e quantificação de *Enterococcus*

**Tabela 23** - Cálculo da variância - Pesquisa e Quantificação de *Enterococcus*

Ensaio	Data	Lote do Meio	PR1	PR2	Log(PR1)	Log(PR2)	Variância
1	3-jan-14	86Q	10	17	1,00	1,23	0,0266
2	6-jan-14	86Q	33	36	1,52	1,56	0,0007
3	10-jan-14	86Q	33	34	1,52	1,53	0,0001
4	13-jan-14	86Q	30	18	1,48	1,26	0,0246
5	17-jan-14	86Q	56	40	1,75	1,60	0,0107
6	20-jan-14	86Q	34	37	1,53	1,57	0,0007
7	24-jan-14	88Q	44	40	1,64	1,60	0,0009
8	27-jan-14	88Q	138	172	2,14	2,24	0,0046
9	31-jan-14	88Q	159	172	2,20	2,24	0,0006
10	3-fev-14	88Q	94	54	1,97	1,73	0,0290
11	7-fev-14	89Q	51	62	1,71	1,79	0,0036
12	10-fev-14	89Q	15	17	1,18	1,23	0,0015
13	14-fev-14	89Q	150	142	2,18	2,15	0,0003
14	17-fev-14	89Q	88	47	1,94	1,67	0,0371
15	21-fev-14	91Q	71	80	1,85	1,90	0,0013
16	24-fev-14	91Q	23	24	1,36	1,38	0,0002
17	28-fev-14	91Q	34	24	1,53	1,38	0,0114
18	3-mar-14	91Q	17	13	1,23	1,11	0,0068
19	7-mar-14	93Q	27	20	1,43	1,30	0,0085
20	10-mar-14	93Q	62	80	1,79	1,90	0,0061

**Tabela 24** - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - *Enterococcus*

Variância da reprodutibilidade, $S_R^2$	0,0088
Desvio Padrão da reprodutibilidade, SR	0,0594
Incerteza expandida, U	0,12

**b) Microrganismos a 22 °C****Tabela 25** - Cálculo da variância - Contagem de Microrganismos a 22 °C

Ensaio	Data	Lote do Meio	PR1	PR2	Log(PR1)	Log(PR2)	Variância
1	3-jan-14	79V	44	52	1,64	1,72	0,003
2	6-jan-14	79V	44	63	1,64	1,80	0,012
3	10-jan-14	79V	71	52	1,85	1,72	0,009
4	13-jan-14	79V	71	63	1,85	1,80	0,001
5	17-jan-14	79V	44	40	1,64	1,60	0,001
6	20-jan-14	79V	44	31	1,64	1,49	0,012
7	24-jan-14	79V	71	40	1,85	1,60	0,031
8	27-jan-14	79V	71	31	1,85	1,49	0,065
9	31-jan-14	79V	44	83	1,64	1,92	0,038
10	3-fev-14	79V	44	95	1,64	1,98	0,056
11	7-fev-14	85V	71	83	1,85	1,92	0,002
12	10-fev-14	85V	71	95	1,85	1,98	0,008
13	14-fev-14	85V	52	40	1,72	1,60	0,006
14	17-fev-14	85V	52	31	1,72	1,49	0,025
15	21-fev-14	85V	63	40	1,80	1,60	0,019
16	24-fev-14	85V	63	31	1,80	1,49	0,047
17	28-fev-14	85V	52	83	1,72	1,92	0,021
18	3-mar-14	85V	52	95	1,72	1,98	0,034
19	7-mar-14	97V	63	83	1,80	1,92	0,007
20	10-mar-14	97V	63	95	1,80	1,98	0,016

**Tabela 26** - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - Microrganismos a 22 °C

Variância da reprodutibilidade, $S_R^2$	0,0207
Desvio Padrão da reprodutibilidade, SR	0,1439
Incerteza expandida, U	0,29

### c) Microrganismos a 37 °C

**Tabela 27** - Cálculo da variância - Contagem de Microrganismos a 37 °C

Ensaio	Data	Lote do Meio	PR1	PR2	Log(PR1)	Log(PR2)	Variância
1	3-jan-14	79V	47	44	1,67	1,64	0,000
2	6-jan-14	79V	69	53	1,84	1,72	0,007
3	10-jan-14	79V	40	27	1,60	1,43	0,015
4	13-jan-14	79V	40	33	1,60	1,52	0,003
5	17-jan-14	79V	42	27	1,62	1,43	0,018
6	20-jan-14	79V	42	33	1,62	1,52	0,005
7	24-jan-14	79V	40	27	1,60	1,43	0,015
8	27-jan-14	79V	40	26	1,60	1,41	0,018
9	31-jan-14	79V	42	27	1,62	1,43	0,018
10	3-fev-14	79V	42	26	1,62	1,41	0,022
11	7-fev-14	85V	40	30	1,60	1,48	0,008
12	10-fev-14	85V	42	30	1,62	1,48	0,011
13	14-fev-14	85V	27	27	1,43	1,43	0,000
14	17-fev-14	85V	27	26	1,43	1,41	0,000
15	21-fev-14	85V	33	27	1,52	1,43	0,004
16	24-fev-14	85V	33	26	1,52	1,41	0,005
17	28-fev-14	85V	27	30	1,43	1,48	0,001
18	3-mar-14	85V	33	30	1,52	1,48	0,001
19	7-mar-14	97V	27	30	1,43	1,48	0,001
20	10-mar-14	97V	26	30	1,41	1,48	0,002

**Tabela 28** - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - Microrganismos a 37°C

Variância da reprodutibilidade, $S_R^2$	0,0077
Desvio Padrão da reprodutibilidade, $S_R$	0,0877
Incerteza expandida, U	0,18

**d) Pesquisa e quantificação de *Clostridium perfringens*****Tabela 29** - Cálculo da variância - Pesquisa e Quantificação de *Clostridium perfringens*

Ensaio	Data	Lote do Meio	PR1	PR2	Log(PR1)	Log(PR2)	Variância
1	3-jan-14	25T	16	15	1,20	1,18	0,000
2	6-jan-14	25T	58	71	1,76	1,85	0,004
3	10-jan-14	29T	34	40	1,53	1,60	0,002
4	13-jan-14	29T	19	25	1,28	1,40	0,007
5	17-jan-14	29T	81	80	1,91	1,90	0,000
6	20-jan-14	29T	83	80	1,92	1,90	0,000
7	24-jan-14	32T	117	115	2,07	2,06	0,000
8	27-jan-14	32T	122	115	2,09	2,06	0,000
9	31-jan-14	35T	22	36	1,34	1,56	0,023
10	3-fev-14	35T	19	36	1,28	1,56	0,039
11	7-fev-14	38T	20	11	1,30	1,04	0,034
12	10-fev-14	38T	19	27	1,28	1,43	0,012
13	14-fev-14	38T	24	26	1,38	1,41	0,001
14	17-fev-14	40T	10	14	1,00	1,15	0,011
15	21-fev-14	40T	41	48	1,61	1,68	0,002
16	24-fev-14	44T	50	33	1,70	1,52	0,016
17	28-fev-14	44T	82	86	1,91	1,93	0,000
18	3-mar-14	47T	79	67	1,90	1,83	0,003
19	7-mar-14	47T	36	30	1,56	1,48	0,003
20	10-mar-14	50T	35	43	1,54	1,63	0,004

**Tabela 30** - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - *Clostridium perfringens*

Variância da reprodutibilidade, $S_R^2$	0,0080
Desvio Padrão da reprodutibilidade, $S_R$	0,0897
Incerteza expandida, U	0,18

## e) Pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes

**Tabela 31** - Cálculo da variância - Pesquisa e Quantificação de Bactérias Coliformes

Ensaio	Data	Lote do Meio	PR1	PR2	Log(PR1)	Log(PR2)	Variância
1	3-jan-14	950	21	33	1,32	1,52	0,019
2	6-jan-14	950	69	54	1,84	1,73	0,006
3	10-jan-14	950	69	55	1,84	1,74	0,005
4	13-jan-14	950	17	16	1,23	1,20	0,000
5	17-jan-14	950	28	34	1,45	1,53	0,004
6	20-jan-14	950	22	17	1,34	1,23	0,006
7	24-jan-14	980	33	39	1,52	1,59	0,003
8	27-jan-14	980	29	35	1,46	1,54	0,003
9	31-jan-14	980	42	35	1,62	1,54	0,003
10	3-fev-14	980	25	17	1,40	1,23	0,014
11	7-fev-14	01P	33	27	1,52	1,43	0,004
12	10-fev-14	01P	44	51	1,64	1,71	0,002
13	14-fev-14	01P	12	20	1,08	1,30	0,025
14	17-fev-14	01P	58	48	1,76	1,68	0,003
15	21-fev-14	01P	33	41	1,52	1,61	0,004
16	24-fev-14	01P	53	45	1,72	1,65	0,003
17	28-fev-14	01P	60	47	1,78	1,67	0,006
18	3-mar-14	01P	48	39	1,68	1,59	0,004
19	7-mar-14	05P	35	43	1,54	1,63	0,004
20	10-mar-14	05P	55	42	1,74	1,62	0,007

**Tabela 32** - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - Bactérias Coliformes

Variância da reprodutibilidade, $S_R^2$	0,0062
Desvio Padrão da reprodutibilidade, $S_R$	0,0789
Incerteza expandida, U	0,16

f) Pesquisa e quantificação de *Escherichia Coli***Tabela 33** - Cálculo da variância - Pesquisa e Quantificação de *Escherichia coli*

Ensaio	Data	Lote do Meio	PR1	PR2	Log(PR1)	Log(PR2)	Variância
1	3-jan-14	950	17	20	1,23	1,30	0,002
2	6-jan-14	950	41	22	1,61	1,34	0,037
3	10-jan-14	950	14	22	1,15	1,34	0,019
4	13-jan-14	950	22	20	1,34	1,30	0,001
5	17-jan-14	950	24	28	1,38	1,45	0,002
6	20-jan-14	950	91	95	1,96	1,98	0,000
7	24-jan-14	980	81	77	1,91	1,89	0,000
8	27-jan-14	980	11	15	1,04	1,18	0,009
9	31-jan-14	980	14	15	1,15	1,18	0,000
10	3-fev-14	980	13	11	1,11	1,04	0,003
11	7-fev-14	01P	7	9	0,85	0,95	0,006
12	10-fev-14	01P	69	104	1,84	2,02	0,016
13	14-fev-14	01P	64	69	1,81	1,84	0,001
14	17-fev-14	01P	68	70	1,83	1,85	0,000
15	21-fev-14	01P	26	32	1,41	1,51	0,004
16	24-fev-14	01P	30	19	1,48	1,28	0,020
17	28-fev-14	01P	129	147	2,11	2,17	0,002
18	3-mar-14	01P	83	70	1,92	1,85	0,003
19	7-mar-14	05P	55	43	1,74	1,63	0,006
20	10-mar-14	05P	25	39	1,40	1,59	0,019

**Tabela 34** - Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - *Escherichia coli*

Variância da reprodutibilidade, $S_R^2$	0,0074
Desvio Padrão da reprodutibilidade, $S_R$	0,0863
Incerteza expandida, U	0,17

A reprodutibilidade traduz a consistência dos resultados quando a análise se repete por dois operadores diferentes e ambos obtêm resultados semelhantes. Quanto a maior a precisão entre os resultados, maior é a reprodutibilidade intralaboratorial. A reprodutibilidade do método avalia a capacidade do método em produzir resultados consistentes, quando realizados independentemente.

A incerteza é o parâmetro que se encontra associado ao resultado de uma medição e caracteriza a dispersão de valores que se pode, razoavelmente, à mensuranda. Pode ser expressa como intervalo de logaritmo de base 10, em valores naturais (número de ufc). Não devem ser usados mais do que dois algarismos significativos para reportar os resultados.

Os métodos utilizados para a determinação dos diferentes parâmetros, conduziram a valores de incerteza expandida bastante satisfatórios (Tabela 23 à Tabela 34), pelo que se concluiu que todos conduzem a resultados consistentes.

#### **4.1.4. Cartas guia**

As cartas guia são construídas sempre com recurso a MRC, pois é necessário ter-se conhecimento da carga microbiana existente na amostra. É um tipo de gráfico utilizado para avaliação de tendências e verificar se o método está sob controlo, isto é, isento de causas especiais.

Estes gráficos fornecem uma regra de decisão muito simples: pontos dispostos fora dos limites de controlo indicam que o método está “fora de controlo”. Quando todos os pontos estão dentro dos limites e dispostos de forma aleatória, são considerados resultados satisfatórios.

Apesar de se poderem construir cartas guia com apenas 10 ensaios, optou-se por se realizar 20 ensaios. É de referenciar que estas cartas de controlo têm que ser construídas com MRC do mesmo lote, pelo que uma vez esgotado o lote tem que se dar início a uma nova carta.

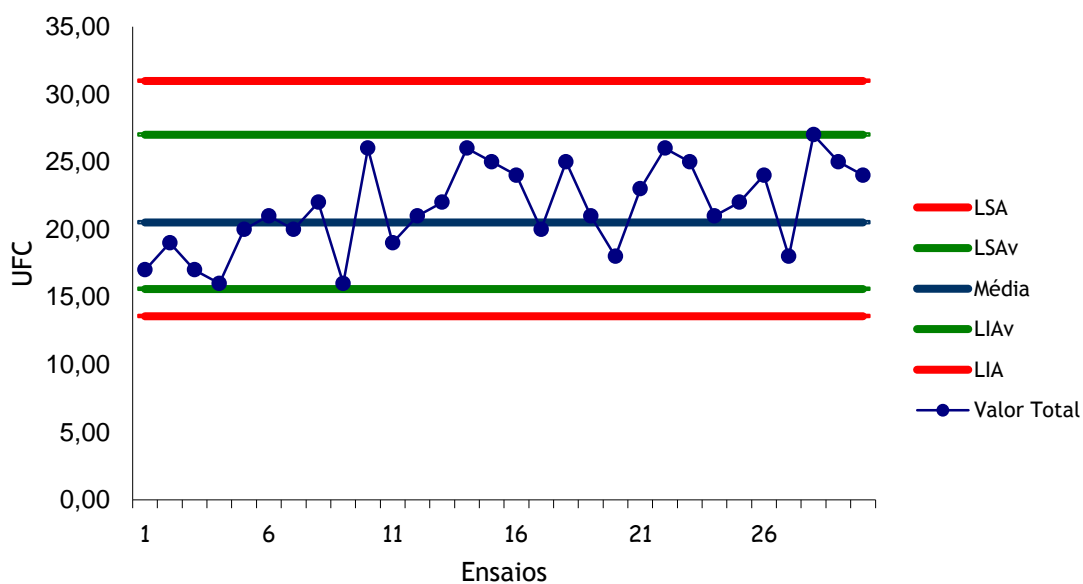
Os resultados foram tratados em folha de excell (Tabela 35 à Tabela 46) e de acordo com o descrito no capítulo 3.

a) Pesquisa e quantificação de *Enterococcus***Tabela 35** - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Pesquisa e quantificação de *Enterococcus*

Ensaio	Data	Lote do Meio	Valor Total	Log(Valor Total)	ABS[Xi-(Xi-1)]
1	3-jan-14	86Q	17	1,23	
2	6-jan-14	86Q	19	1,28	0,05
3	10-jan-14	86Q	17	1,23	0,05
4	13-jan-14	86Q	16	1,20	0,03
5	17-jan-14	86Q	20	1,30	0,10
6	20-jan-14	86Q	21	1,32	0,02
7	24-jan-14	88Q	20	1,30	0,02
8	27-jan-14	88Q	22	1,34	0,04
9	31-jan-14	88Q	16	1,20	0,14
10	3-fev-14	88Q	26	1,41	0,21
11	7-fev-14	89Q	19	1,28	0,14
12	10-fev-14	89Q	21	1,32	0,04
13	14-fev-14	89Q	22	1,34	0,02
14	17-fev-14	89Q	26	1,41	0,07
15	21-fev-14	91Q	25	1,40	0,02
16	24-fev-14	91Q	24	1,38	0,02
17	28-fev-14	91Q	20	1,30	0,08
18	3-mar-14	91Q	25	1,40	0,10
19	7-mar-14	93Q	21	1,32	0,08
20	10-mar-14	93Q	18	1,26	0,07
21	14-mar-14	93Q	23	1,36	0,11
22	17-mar-14	93Q	26	1,41	0,05
23	21-mar-14	93Q	25	1,40	0,02
24	24-mar-14	96Q	21	1,32	0,08
25	28-mar-14	96Q	22	1,34	0,02
26	31-mar-14	96Q	24	1,38	0,04
27	4-abr-14	96Q	18	1,26	0,12
28	7-abr-14	96Q	27	1,43	0,18
29	11-abr-14	98Q	25	1,40	0,03
30	15-abr-14	93Q	24	1,38	0,02

**Tabela 36** - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia - *Enterococcus*

LIMITES	
X	1,31
R	0,067
S	0,060
LSA	30,98
LSAv	27,01
Média	20,52
LIAv	15,59
LIA	13,59



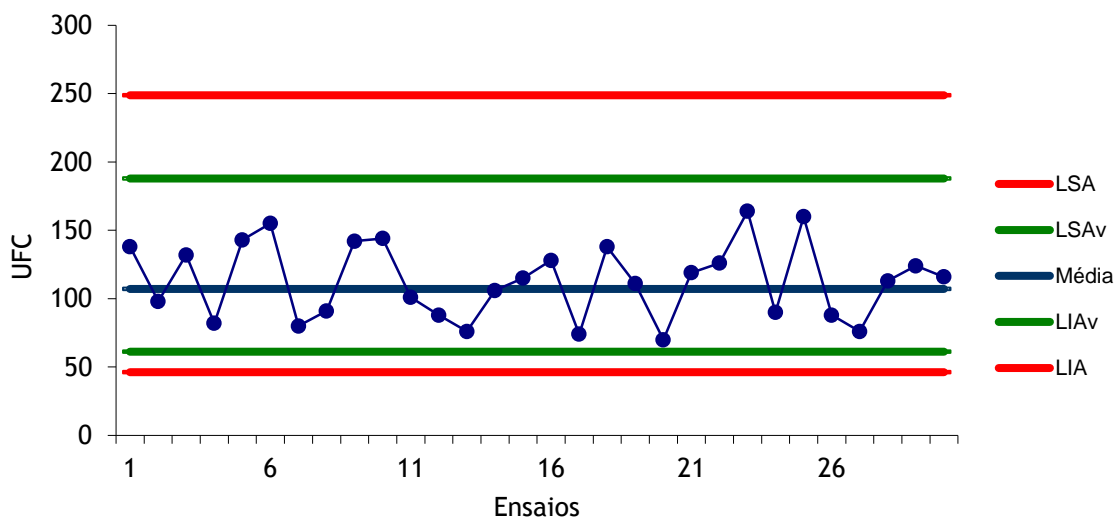
**Figura 21** - Carta guia - *Enterococcus*

**b) Contagem de microrganismos a 22 °C****Tabela 37** - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Contagem de Microrganismos a 22 °C

Ensaio	Data	Lote do Meio	Valor Total	Log(Valor Total)	ABS[Xi-(Xi-1)]
1	3-jan-14	79V	138	2,14	#VALOR!
2	6-jan-14	79V	98	1,99	0,15
3	10-jan-14	79V	132	2,12	0,13
4	13-jan-14	79V	82	1,91	0,21
5	17-jan-14	79V	143	2,16	0,24
6	20-jan-14	79V	155	2,19	0,03
7	24-jan-14	79V	80	1,90	0,29
8	27-jan-14	79V	91	1,96	0,06
9	31-jan-14	79V	142	2,15	0,19
10	3-fev-14	79V	144	2,16	0,01
11	7-fev-14	85V	101	2,00	0,15
12	10-fev-14	85V	88	1,94	0,06
13	14-fev-14	85V	76	1,88	0,06
14	17-fev-14	85V	106	2,03	0,14
15	21-fev-14	85V	115	2,06	0,04
16	24-fev-14	85V	128	2,11	0,05
17	28-fev-14	85V	74	1,87	0,24
18	3-mar-14	85V	138	2,14	0,27
19	7-mar-14	97V	111	2,05	0,09
20	10-mar-14	97V	70	1,85	0,20
21	14-mar-14	97V	119	2,08	0,23
22	17-mar-14	97V	126	2,10	0,02
23	21-mar-14	97V	164	2,21	0,11
24	24-mar-14	04W	90	1,95	0,26
25	28-mar-14	04W	160	2,20	0,25
26	31-mar-14	04W	88	1,94	0,26
27	4-abr-14	04W	76	1,88	0,06
28	7-abr-14	04W	113	2,05	0,17
29	11-abr-14	04W	124	2,09	0,04
30	15-abr-14	04W	116	2,06	0,03

**Tabela 38** - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia - Microrganismos a 22 °C

LIMITES	
X	2,03
R	0,14
S	0,12
LSA	248,78
LSAv	187,92
Média	107,23
LIAv	61,19
LIA	46,22



**Figura 22** - Carta guia - Microrganismos a 22 °C

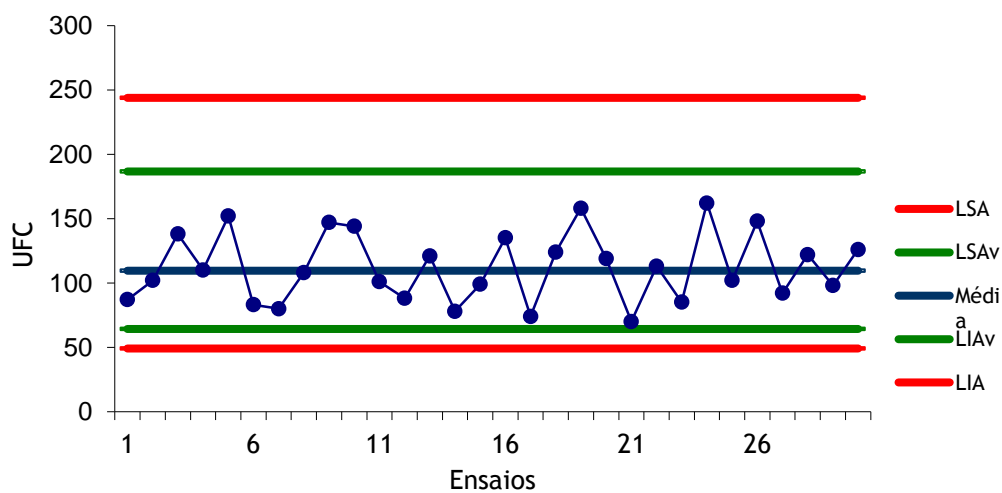
## c) Contagem de microrganismos a 37 °C

**Tabela 39** - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Contagem de Microrganismos a 37 °C

Ensaio	Data	Lote do Meio	Valor Total	Log(Valor Total)	ABS[Xi-(Xi-1)]
1	3-jan-14	79V	87	1,94	
2	6-jan-14	79V	102	2,01	0,07
3	10-jan-14	79V	138	2,14	0,13
4	13-jan-14	79V	110	2,04	0,10
5	17-jan-14	79V	152	2,18	0,14
6	20-jan-14	79V	83	1,92	0,26
7	24-jan-14	79V	80	1,90	0,02
8	27-jan-14	79V	108	2,03	0,13
9	31-jan-14	79V	147	2,17	0,13
10	3-fev-14	79V	144	2,16	0,01
11	7-fev-14	85V	101	2,00	0,15
12	10-fev-14	85V	88	1,94	0,06
13	14-fev-14	85V	121	2,08	0,14
14	17-fev-14	85V	78	1,89	0,19
15	21-fev-14	85V	99	2,00	0,10
16	24-fev-14	85V	135	2,13	0,13
17	28-fev-14	85V	74	1,87	0,26
18	3-mar-14	85V	124	2,09	0,22
19	7-mar-14	97V	158	2,20	0,11
20	10-mar-14	97V	119	2,08	0,12
21	14-mar-14	97V	70	1,85	0,23
22	17-mar-14	97V	113	2,05	0,21
23	21-mar-14	97V	85	1,93	0,12
24	24-mar-14	04W	162	2,21	0,28
25	28-mar-14	04W	102	2,01	0,20
26	31-mar-14	04W	148	2,17	0,16
27	4-abr-14	04W	92	1,96	0,21
28	7-abr-14	04W	122	2,09	0,12
29	11-abr-14	04W	98	1,99	0,10
30	15-abr-14	04W	126	2,10	0,11

**Tabela 40** - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia -  
Microorganismos a 37 °C

LIMITES	
X	2,04
R	0,13
S	0,12
LSA	243,74
LSAv	186,61
Média	109,38
LIAv	64,12
LIA	49,09



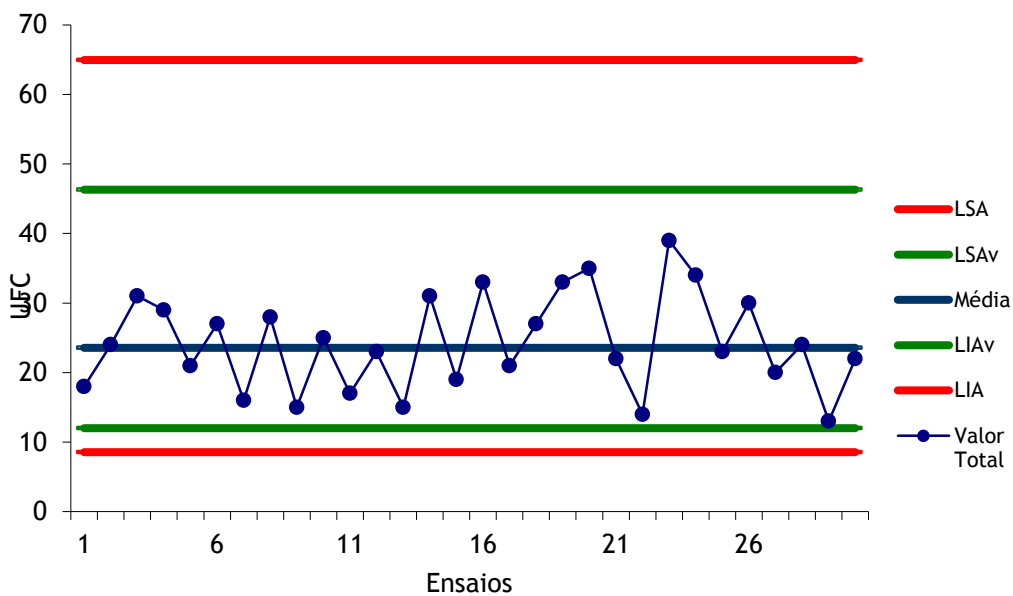
**Figura 23** - Carta guia - Microorganismos a 37 °C

**d) Pesquisa e Quantificação de *Clostridium perfringens*****Tabela 41** - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Pesquisa e Quantificação de *Clostridium perfringens*

Ensaio	Data	Lote do Meio	Valor Total	Log(Valor Total)	ABS[Xi-(Xi-1)]
1	3-jan-14	25T	18	1,26	
2	6-jan-14	25T	24	1,38	0,12
3	10-jan-14	29T	31	1,49	0,11
4	13-jan-14	29T	29	1,46	0,03
5	17-jan-14	29T	21	1,32	0,14
6	20-jan-14	29T	27	1,43	0,11
7	24-jan-14	32T	16	1,20	0,23
8	27-jan-14	32T	28	1,45	0,24
9	31-jan-14	35T	15	1,18	0,27
10	3-fev-14	35T	25	1,40	0,22
11	7-fev-14	38T	17	1,23	0,17
12	10-fev-14	38T	23	1,36	0,13
13	14-fev-14	38T	15	1,18	0,19
14	17-fev-14	40T	31	1,49	0,32
15	21-fev-14	40T	19	1,28	0,21
16	24-fev-14	44T	33	1,52	0,24
17	28-fev-14	44T	21	1,32	0,20
18	3-mar-14	47T	27	1,43	0,11
19	7-mar-14	47T	33	1,52	0,09
20	10-mar-14	50T	35	1,54	0,03
21	14-mar-14	50T	22	1,34	0,20
22	17-mar-14	55T	14	1,15	0,20
23	21-mar-14	55T	39	1,59	0,44
24	24-mar-14	55T	34	1,53	0,06
25	28-mar-14	62T	23	1,36	0,17
26	31-mar-14	62T	30	1,48	0,12
27	4-abr-14	62T	20	1,30	0,18
28	7-abr-14	62T	24	1,38	0,08
29	11-abr-14	65T	13	1,11	0,27
30	15-abr-14	65T	22	1,34	0,23

**Tabela 42** - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia - *Clostridium perfringens*

LIMITES	
X	1,37
R	0,17
S	0,15
LSA	64,96
LSAv	46,32
Média	23,55
LIAv	11,98
LIA	8,54



**Figura 24** - Carta guia - *Clostridium perfringens*

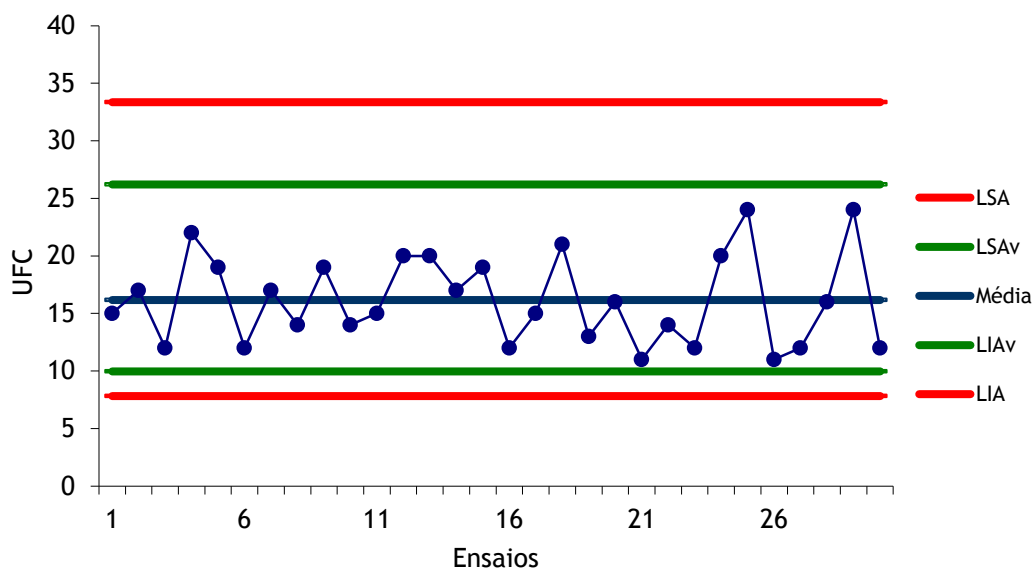
## e) Pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes

**Tabela 43** - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Pesquisa e Quantificação de Bactérias Coliformes

Ensaio	Data	Lote do Meio	Valor Total	Log(Valor Total)	ABS[Xi-(Xi-1)]
1	3-jan-14	950	15	1,18	
2	6-jan-14	950	17	1,23	0,05
3	10-jan-14	950	12	1,08	0,15
4	13-jan-14	950	22	1,34	0,26
5	17-jan-14	950	19	1,28	0,06
6	20-jan-14	950	12	1,08	0,20
7	24-jan-14	980	17	1,23	0,15
8	27-jan-14	980	14	1,15	0,08
9	31-jan-14	980	19	1,28	0,13
10	3-fev-14	980	14	1,15	0,13
11	7-fev-14	01P	15	1,18	0,03
12	10-fev-14	01P	20	1,30	0,12
13	14-fev-14	01P	20	1,30	0,00
14	17-fev-14	01P	17	1,23	0,07
15	21-fev-14	01P	19	1,28	0,05
16	24-fev-14	01P	12	1,08	0,20
17	28-fev-14	01P	15	1,18	0,10
18	3-mar-14	01P	21	1,32	0,15
19	7-mar-14	05P	13	1,11	0,21
20	10-mar-14	05P	16	1,20	0,09
21	14-mar-14	05P	11	1,04	0,16
22	17-mar-14	05P	14	1,15	0,10
23	21-mar-14	05P	12	1,08	0,07
24	24-mar-14	05P	20	1,30	0,22
25	28-mar-14	05P	24	1,38	0,08
26	31-mar-14	05P	11	1,04	0,34
27	4-abr-14	08P	12	1,08	0,04
28	7-abr-14	08P	16	1,20	0,12
29	11-abr-14	08P	24	1,38	0,18
30	15-abr-14	12P	12	1,08	0,30

**Tabela 44** - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia - Bactérias Coliformes

LIMITES	
X	1,21
R	0,12
S	0,10
LSA	33,35
LSAv	26,20
Média	16,16
LIAv	9,97
LIA	7,83



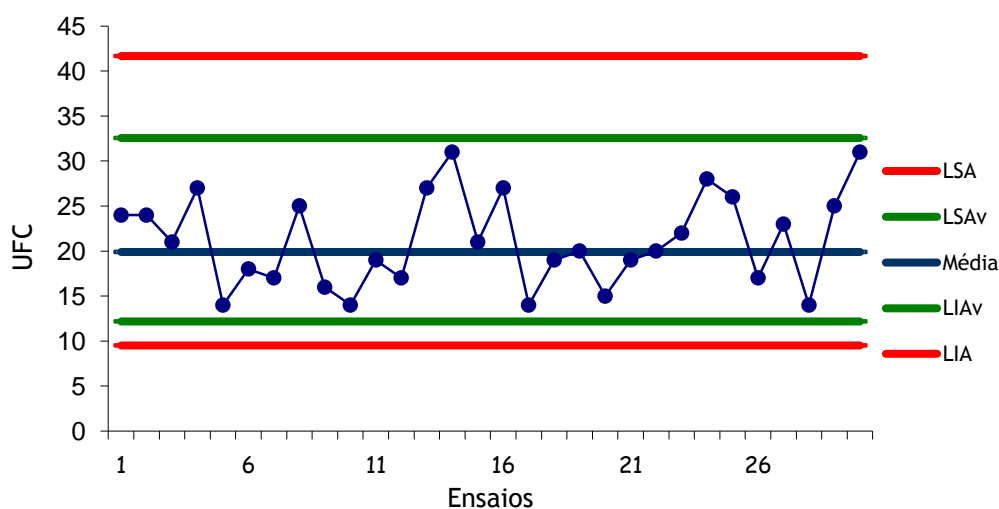
**Figura 25** - Carta guia - Bactérias Coliformes

f) Pesquisa e quantificação de *Escherichia Coli***Tabela 45** - Resultados obtidos para a construção da carta guia - Pesquisa e quantificação de *Escherichia coli*

Ensaio	Data	Lote do Meio	Valor Total	Log(Valor Total)	ABS[ $X_i - (X_i - 1)$ ]
1	3-jan-14	950	24	1,38	
2	6-jan-14	950	24	1,38	0,00
3	10-jan-14	950	21	1,32	0,06
4	13-jan-14	950	27	1,43	0,11
5	17-jan-14	950	14	1,15	0,29
6	20-jan-14	950	18	1,26	0,11
7	24-jan-14	980	17	1,23	0,02
8	27-jan-14	980	25	1,40	0,17
9	31-jan-14	980	16	1,20	0,19
10	3-fev-14	980	14	1,15	0,06
11	7-fev-14	01P	19	1,28	0,13
12	10-fev-14	01P	17	1,23	0,05
13	14-fev-14	01P	27	1,43	0,20
14	17-fev-14	01P	31	1,49	0,06
15	21-fev-14	01P	21	1,32	0,17
16	24-fev-14	01P	27	1,43	0,11
17	28-fev-14	01P	14	1,15	0,29
18	3-mar-14	01P	19	1,28	0,13
19	7-mar-14	05P	20	1,30	0,02
20	10-mar-14	05P	15	1,18	0,12
21	14-mar-14	05P	19	1,28	0,10
22	17-mar-14	05P	20	1,30	0,02
23	21-mar-14	05P	22	1,34	0,04
24	24-mar-14	05P	28	1,45	0,10
25	28-mar-14	05P	26	1,41	0,03
26	31-mar-14	05P	17	1,23	0,18
27	4-abr-14	08P	23	1,36	0,13
28	7-abr-14	08P	14	1,15	0,22
29	11-abr-14	08P	25	1,40	0,25
30	15-abr-14	12P	31	1,49	0,09

**Tabela 46** - Registo dos limites de controlo para a elaboração das cartas guia - *Escherichia coli*

LIMITES	
X	1,30
R	0,12
S	0,11
LSA	41,66
LSAv	32,57
Média	19,91
LIAv	12,17
LIA	9,52



**Figura 26** - Carta guia - *Escherichia coli*

Através da análise das cartas guia de todos os métodos em estudo (Figura 21 à Figura 26), e consultando os critérios de aceitação enumerados no capítulo 3, secção 3.3.1., alínea c), verificou-se que todos os pontos se encontram dentro dos limites e dispostos de forma aleatória. Não ocorreram violações dos limites de alarme, pelo que os métodos se encontram dentro de controlo, conduzindo desta forma a resultados credíveis para os clientes.

## 4.2. Controlo de Qualidade externo

A Labinter participa regularmente em ensaios interlaboratoriais para avaliar o desvio do laboratório, mas também para verificar a validade de todo o sistema de qualidade.

Anualmente efectua-se uma nova inscrição nos Ensaio Interlaboratoriais de Águas (*Drinking water scheme*) e Alimentos (*Standard Scheme*), através do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Esta participação tem que ser efectuada pelo menos uma vez por ano com resultados satisfatórios.

## **Capitulo 5 - Conclusão e perspectivas de trabalho futuro**

## Capítulo 5 - Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

Os requisitos gerais para a acreditação encontram-se na norma internacional "Requisitos gerais para a competência de laboratórios de calibração e ensaios" (NP EN ISO/IEC 17025: 2005). Os laboratórios devem cumprir todos os requisitos presentes nesta norma para obter a acreditação.

No presente estágio, teve-se a perspectiva de um Laboratório Acreditado, e do exaustivo processo para implementação e validação de métodos de ensaio. A este processo encontra-se associado um apertado controlo de qualidade interno e externo, tal como se encontra previsto na Norma NP EN ISO/IEC 17025.

A validação de um método de ensaio é um dos procedimentos obrigatórios no âmbito da acreditação de um laboratório.

Um método de referência é um método minuciosamente investigado, descrevendo de forma clara e exacta as condições e procedimentos necessários para a determinação de um ou mais valores de propriedades, com a exactidão e precisão adequadas ao uso e que, por sua vez, pode ser usado na avaliação da aptidão de outros métodos para as mesmas determinações, em particular, na caracterização de um material de referência. É, normalmente, um método de referência nacional ou internacional [42].

Foram utilizados métodos de referência para a determinação de todos os microrganismos que fazem parte do controlo de rotina para avaliação da qualidade microbiológica da água para consumo humano (Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de agosto).

A definição internacional para incerteza da medição é dada no vocabulário internacional de metrologia (VIM), 2012. A abordagem geral para avaliar e expressar a incerteza em ensaios, é baseada somente nas recomendações produzidas pelo Comité Internacional de Pesos e Medidas (CIPM), como descrito no Guia para a Expressão da Incerteza na Medição, 1995, ISO Genebra [46].

Os testes microbiológicos aparecem na categoria daqueles em que é excluído o rigor na validação dos cálculos metrológicos e estatísticos na medição da incerteza. Usualmente, é apropriado sustentar a estimativa da incerteza tendo somente como ponto de partida a repetibilidade e reprodutibilidade.

Sempre que foi necessário utilizar amostras artificialmente contaminadas foram utilizados materiais de referência certificados uma vez que fornecem a rastreabilidade necessária às medições e garantem uma maior exactidão dos resultados.

Todos os equipamentos utilizados suscetíveis de calibração encontravam-se calibrados e possuíam os respetivos certificados de calibração. A calibração dos aparelhos do laboratório é feita por uma empresa externa acreditada para o efeito.

O controlo de qualidade interno consiste em procedimentos efetuados pelo laboratório para uma avaliação contínua do trabalho do mesmo. O objectivo principal é assegurar a consistência dos resultados no dia a dia e, a sua conformidade com os critérios definidos.

Está implementado um programa de verificações periódicas para demonstrar que a variabilidade (entre analistas e entre equipamentos ou materiais), está sob controlo. Todos os ensaios incluídos no âmbito da acreditação do laboratório, estão cobertos.

Este programa envolve:

- uso de amostras contaminadas;
- uso de materiais de referência (incluindo de esquemas de ensaios interlaboratoriais);
- ensaios em duplicado;
- ensaios de paralelos;
- avaliação de resultados de ensaios de duplicados e paralelos.

Os laboratório participa regularmente em ensaios interlaboratoriais que são relevantes para o âmbito da acreditação.

O laboratório utiliza a avaliação de qualidade externa, não apenas para avaliar o desvio do laboratório, mas também para verificar a validade de todo o sistema de qualidade.

A acreditação é obrigatória por legislação, Decreto-lei N.º 306/2007 de 27 de Agosto, pelo que os laboratórios que efectuem análises a águas de consumo humano, têm que ser acreditados pelo IPAC e reconhecidos pela entidade competente ERSAR. Relativamente a outras análises alimentares, águas de piscina, entre outras, a acreditação não é exigida por lei.

Apesar da acreditação dar credibilidade ao laboratório, o que hoje em dia, é uma mais valia, os custos envolvidos neste processo são demasiadamente elevados e vão inflacionar o preço no preço final da análise. Este facto é claramente uma desvantagem uma vez que alguns clientes acabam por optar por um laboratório não acreditado, que por não terem custos associados à acreditação lhes vai permitir praticar preços mais baixos.

As análises microbiológicas foram efetuadas sob supervisão de um analista com experiência, qualificado e habilitado.

Este estágio possibilitou obter experiência na prática de análises microbiológicas de controlo de rotina realizadas em águas de consumo humano tendo sido possível tomar conhecimento do processo de validação e implementação de métodos de análise microbiológicos, bem como de todo o processo de controlo de qualidade interno e respectivo tratamento estatístico.

Foi também possível compreender a importância da análise microbiológica em águas de consumo humano, visto que inicialmente somente se verificavam as propriedades organolépticas da mesma, o que levava a surtos epidémicos e a uma falta de confiança por parte do consumidor final. Desta forma tornou-se imperativo estabelecer valores paramétricos químicos e microbiológicos que possam ser aceitáveis para garantir a qualidade da água de consumo humano. Actualmente mais de 5 mil milhões pessoas em todo o mundo já tem acesso à água potável.

A nível de trabalho futuro, existe uma variada gama de matrizes a estudar, tal como e.g. águas de piscina, águas balneares, águas de processo e águas residuais. Todo o trabalho apresentado tem que ser efectuado para as diferentes matrizes, bem como podem ser desenvolvidos outros parâmetros indo ao encontro das diferentes legislações.

## Bibliografia

- [1] Vieira, J.M.P.; Morais, C. (2005). *Planos de Segurança da água para consumo humano em sistemas público de abastecimento*.
- [2] Ferreira, W.F.C.F.; Sousa J.C.F.S. (1998). *Microbiologia*, vol.I, Ed. Lidel.
- [3] <http://www.ensp.unl.pt/dispositivos-deapoio/cdi/cdi/sectordepublicacoes/revista/2000-2008/pdfs/rpsp-1-2009-1/07-2009.pdf> - Consultado em 01-04-2013
- [4] WHO (2011) - *Guidelines for Drinking-Water Quality*, 4<sup>th</sup> ed., Genev Health Organization, 2004a.
- [5] Bernardo, M. (2007). *Comparação dos métodos aplicados na detecção de bactérias coliformes, Escherichia coli e Enterococcus sp. em águas para fins recreativos*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve. Portugal. Dissertação de mestrado.
- [6] Fundação Nacional de Saúde (2013). *Manual prático de análise de água* / Fundação Nacional de Saúde, 4<sup>a</sup>. ed., Brasília, Brasil.
- [7][http://www.apda.pt/site/ficheiros\\_eventos/201212041542ft\\_mb\\_02\\_bacterias\\_coliformes.pdf](http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201212041542ft_mb_02_bacterias_coliformes.pdf) -Consultado em 05-04-2013
- [8] Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de agosto. *Controlo da qualidade da água destinada ao consumo humano*.
- [9] Recomendação IRAR n.º 05/2007. *Desinfeção da água destinada ao consumo humano*.
- [10] Rodier, J.; Legube, B.; Merlet, N.; Brunet R. (2009). *L'Analyse de l'eau*, 9<sup>e</sup> ed., Ed. Dunod, France.
- [11] *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2012). 22<sup>st</sup> edition. American Public Health Association, American Water Works association and Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- [12][http://www.apda.pt/site/ficheiros\\_eventos/201212041542ft\\_mb\\_03\\_escherichia\\_coli.pdf](http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201212041542ft_mb_03_escherichia_coli.pdf) Consultado em 05-04-2013
- [13] López-pila, J.M.; Szewzyk, R.(2000). *Estimating the infection risk in recreational waters from the faecal indicator concentration and from the ratio between pathogens and indicators*, Water Research, vol 34.

[14] Youn-Joo, A.N; Kampbell, D.H.; Breidenbach,G.P.(2002). *Escherichia coli and total coliforms in water and sediments at lake marinas*, Environmental Pollution, 120(3), 771-3.

[15] Lebaron, P., et al.(2005). *An operational method for the real-time monitoring of E. coli numbers in bathing waters*. Marine Pollution Bulletin, 50(6), 652-9.

[16] CONAMA: Conselho Nacional De Meio Ambiente. Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, Brasil.

[17] Mascarenhas, A.; Martins, J.; Neves, M.(2002). *Avaliação de tratamento de águas superficiais efectuado na ETA de Alcantarilha com base na análise de indicadores de poluição fecal*, Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Tese de mestrado.

[18][http://www.apda.pt/site/ficheiros\\_eventos/201212041540ft\\_mb\\_01\\_numero\\_de\\_colonias\\_a\\_22c\\_e\\_37c.pdf](http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201212041540ft_mb_01_numero_de_colonias_a_22c_e_37c.pdf). Consultado em 25-03-2013

[19][http://www.apda.pt/site/ficheiros\\_eventos/201212041543ft\\_mb\\_05\\_clostridium\\_perfringens.pdf](http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201212041543ft_mb_05_clostridium_perfringens.pdf) Consultado em 25-03-2013

[20] Rolim, S. (2000). *Sistemas de lagoas de estabilización*, Ed. Mc Graw Hill, Bogotá. Primera edición. Consultado em 25-03-2013

[21][http://www.bvsde.paho.org/cdgdwq/docs\\_microbiologicos/Indicadores%20PDF/Clostridium.pdf](http://www.bvsde.paho.org/cdgdwq/docs_microbiologicos/Indicadores%20PDF/Clostridium.pdf) Consultado em 25-03-2013

[22][http://www.apda.pt/site/ficheiros\\_eventos/201212041543ft\\_mb\\_04\\_enterococos\\_intestinais.pdf](http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201212041543ft_mb_04_enterococos_intestinais.pdf) Consultado em 25-03-2013

[23] Forsythe, S.J. (2002) *Microbiologia da Segurança Alimentar*, Ed. Artmed, Porto Alegre, Brasil.

[24] Franco, B.D.G.M; Landgraf, M. (1999). *Microbiologia dos Alimentos*, Ed. Atheneu, São Paulo, Brasil.

[25] Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case C.L.(2012). *Microbiologia*, 10ª ed., Ed. Artmed.

[26]<http://pessoal.utfpr.edu.br/lucianamaia/arquivos/crescimentomicrobiano.pdf> Consultado em 7-04-2013

[27]<http://professor.ucg.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/5583/material/Meios%20de%20Cultura%20aula%20pr%C3%A1tica.pdf> Consultado em 15-03-2013

- [28] Trindade, J. (2013). *Métodos Alternativos de Detecção de salmonela e Listéria monocytogenes*, Universidade de Aveiro, Portugal, Tese de mestrado.
- [29] Regulamento (CE) n.º 852/2004. Regulamento do parlamento europeu e do conselho de 29 de Abril de 2004.
- [30] NP EN ISO/IEC 17025: 2005. *Requisitos gerais de competência para laboratórios de Ensaio e Calibração* (ISO/IEC 17025: 2005).
- [31] NP EN ISO 9001:2008. *Sistemas de Gestão da Qualidade. Requisitos* (ISO 9001:2008).
- [32] Regulamento (CE) n.o 2073/2005. *Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios*.
- [33] Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.º. 2073/2005. *Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios*.
- [34] ISO 19458:2006, *Water Quality: Sampling for microbiological analysis*.
- [35] ISO 6222:1999 , *Water quality: Enumeration of culturable micro-organisms -- Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*.
- [36] MI 001 V.1.2 (2012-04-18): *Pesquisa e Quantificação de Enterococos e Echerichia Coli*.
- [37] Environment agency. *The Microbiology of Drinking Water (2010) - Part 6: Methods for the isolation and enumeration of sulphite-reducing clostridia and Clostridium perfringens by membrane filtration*.
- [38] ISO 7899-2:2000 *Water quality: Detection and enumeration of intestinal enterococci -- Part 2: Membrane filtration method*.
- [39] ISO 16266:2006, *Water quality: Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa -- Method by membrane filtration*.
- [40] NP 4343:1998, *Pesquisa e Quantificação de Staphylococcus*.
- [41] ISO 19250:2010, *Water quality -- Detection of Salmonella spp*.
- [42] Guia relacre 6: *Acreditação de Laboratórios de ensaios microbiológicos*, 2ª ed., Junho 07.
- [43] Guia para a aplicação da NP EN ISO/17025 - OGC 2010-03-30, IPAC.

- [44] VIM: 1993 ISO International: *Vocabulary of basic and general terms in metrology*.
- [45] ANVISA: Agência Nacional De Vigilância Sanitária, *Habilitação para Laboratórios de Microbiologia*, vol. 3, Março 2006.
- [46] OGC 005 *Guia para a estimativa de incerteza em ensaios microbiológicos* (31-01-200.6), IPAC .
- [47] [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7ac8478047458938932fd73fbc4c6735/curs\\_o\\_incertezas\\_digital\\_031105.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7ac8478047458938932fd73fbc4c6735/curs_o_incertezas_digital_031105.pdf?MOD=AJPERES) Consultado em 23-01-2013
- [48] <file:///C:/Users/Ama/Downloads/Resumo%20%20Estimativa%20de%20Incerteza%20de%20Medição%20na%20Microbiologia.pdf> Consultado em 23-01-2013
- [49] ISO/TS 21748:2004: *Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation*.
- [50] Recomendação ERSAR nº 03/2010: *Procedimento para a colheita de amostras de água para consumo humano em sistemas de abastecimento*.
- [51] Regulamento Geral de Acreditação. DRC 001.(2012) . IPAC.
- [52] [http://www.epralima.com/iga/index2.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=70&Itemid=99](http://www.epralima.com/iga/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=70&Itemid=99) Consultado em 14-03-2013
- [53] Recomendação IRAR nº 05/2005 - *Método alternativo para análise de bactérias coliformes e Echerichia Coli*.
- [54] Environment Agency. *The microbiology of drinking water*, (2012). Part 5 - *Methods for the isolation enumeration of enterococci*.
- [55] ISO 68871: 1999, *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of thesis samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*. Part 1: general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
- [56] *The Microbiology of Drinking Water* (2009) - Part 4 - *Methods for the isolation and enumeration of coliform bacteria and Escherichia coli (including E. coli O157:H7)*.