



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

Rita Salomé Simões Melanda

**IMPLEMENTAÇÃO, PARA ACREDITAÇÃO EM  
LABORATÓRIO, DO MÉTODO SYMPHONY|  
AGAR PARA A QUANTIFICAÇÃO DE BOLORES  
E LEVEDURAS EM PRODUTOS ALIMENTARES**

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar  
orientada pelo/a Professor/a Doutor/a Gabriela Jorge da Silva e  
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de  
Coimbra.

Setembro de 2022



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

***Implementação, para acreditação em laboratório, do método  
Symphony agar para quantificação de bolores e leveduras  
em produtos alimentares***

Orientadora: Professora Dr.<sup>a</sup> Gabriela Jorge da Silva

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Joana Gil Castro Silva

Rita Salomé Simões Melanda  
Mestrado em Segurança Alimentar

2022



## **Agradecimentos**

Esta dissertação simboliza o fim de um capítulo da minha vida, o fim da vida de estudante e um adeus à Faculdade de Farmácia e à Universidade de Coimbra. Irá, sem dúvida, deixar saudade mas sinto-me grata por todos estes anos, todo o conhecimento, todos os momentos e todas as pessoas que conheci e que levo comigo para a vida.

Desde já, um muito obrigada aos meus pais, sem eles nada seria possível, obrigada por sempre apoiarem os meus objetivos e por estarem sempre aqui para mim.

Um obrigada a todos os meus amigos, em especial à minha MJ, pela força de vontade, pelo apoio e ajuda ao longo deste ano e, sobretudo, obrigada pela amizade.

Ao meu namorado, obrigada por nunca me deixar baixar os braços, por me puxar sempre para cima e por estar sempre disponível para ser um ombro amigo.

Quero agradecer ao laboratório Globalab, por me permitir desenvolver este trabalho nas suas instalações e por me darem todas as ferramentas necessárias para o realizar. Às meninas da microbiologia, um muito obrigada, por todo o conhecimento, por toda a paciência, por toda a ajuda e força ao longo desta dissertação.

E por último, quero agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Gabriela Silva, por ter aceite ajudar-me e por estar disponível para qualquer dúvida.



## Resumo

Os bolores e leveduras são um dos agentes mais importantes de deterioração alimentar, um grupo vasto e com grande diversidade entre eles. São classificados como organismos mesófilos aeróbios, no entanto, conseguem desenvolver-se num largo espectro de temperatura, pH e atividade de água, o que lhes confere uma capacidade de ocorrerem em qualquer tipo de alimento, incluindo alimentos processados e misturados. A sua deteção depende do tipo de alimento, da espécie envolvida e do grau de contaminação e, a sua flora microbiana é considerada um indicador do índice de higiene, podendo, também, desencadear infeções e reações alérgicas.

Para um correto funcionamento dos sistemas de gestão de segurança dos alimentos nas várias áreas do setor alimentar é imprescindível um controlo de qualidade microbiológica e, para um bom controlo microbiológico é necessário definir critérios e métodos analíticos que garantam uma conformidade entre eles, ou seja, desenvolver métodos que possam ser reconhecidos internacionalmente e que, produzam resultados comparáveis assegurando a qualidade. Para implementação dos métodos em laboratório é necessário a sua validação e, posteriormente, a sua acreditação por entidades competentes.

O método Symphony agar surgiu como um método alternativo à norma ISO 21527:2008, que nos permite proceder à contagem de bolores e leveduras em produtos alimentares, para humanos ou animais, ou para o controlo ambiental de áreas de produção ou águas. As suas principais vantagens, em comparação com a norma, é que, é independente do valor de atividade de água nas várias matrizes alimentares, obtém-se resultados mais rapidamente e foi, previamente, validado pela Association Française de Normalization (AFNOR), de acordo com a ISO 16140-2, logo a implementação do método alternativo irá ser mais rápida e mais fácil para posterior inclusão no âmbito da acreditação. Assim, o objetivo principal deste trabalho é, proceder à implementação do método Symphony agar para a contagem de bolores e leveduras no laboratório Globalab - Ensaios Químicos e Microbiológicos, S.A, em diferentes matrizes alimentares e solicitar a sua acreditação, bem como, proceder ao controlo de qualidade de diversos produtos alimentares.

**Palavras-chave:** Bolores; Leveduras; Symphony agar; Implementação.

## **Abstract**

Yeasts and molds are one of the most important agents of food spoilage, a huge group with great diversity among them. They are classified as aerobic mesophilic organisms, however, they can develop in a wide spectrum of temperature, pH and water activity, which gives them the ability to occur in any type of food, including processed and mixed foods. Its detection depends on the type of food, the species involved and the degree of contamination, and its microbial flora is considered an indicator of the hygiene index, and can also trigger infections and allergic reactions.

For the correct functioning of food safety management systems in the different areas of the food sector, microbiological quality control is essential and, for a good microbiological control, it is necessary to define criteria and analytical methods that guarantee compliance between them, that is, to develop methods that can be internationally recognized and that produce comparable results while ensuring quality. For the implementation of the methods in the laboratory, their validation is necessary and, later, their accreditation by competent entities.

The Symphony agar method emerged as an alternative method to the ISO 21527:2008, which allows us to count molds and yeasts in food products, for humans or animals, or for the environmental control of production areas or water. Its main advantages, compared to the standard method, is that, it is independent of the value of water activity in the various food matrices, results are obtained more quickly and it was previously validated by the Association Française de Normalization (AFNOR), according to ISO 16140-2, so the implementation of the alternative method will be faster and easier for later inclusion in the scope of accreditation. Thus, the main objective of this work is to implement the Symphony agar method for the counting of molds and yeasts in the laboratory Globalab - Ensaios Químicos e Microbiológicas, SA, in different food matrices and request its accreditation, as well as proceed with the quality control of various food products.

**Keywords:** Molds; Yeasts; Symphony agar; Implementation.



# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	iii
<b>Índice de figuras</b> .....	xi
<b>Índice de tabelas</b> .....	xii
<b>Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos</b> .....	xiv
<b>I-Introdução- Enquadramento teórico</b> .....	I
1.1 Microbiologia e Segurança Alimentar .....	1
1.2 Bolores e Leveduras.....	2
Leveduras .....	2
Bolores.....	3
Bolores e leveduras nos alimentos.....	3
Espécies utilizadas na implementação do método Symphony agar .....	5
1.3 Legislação.....	9
1.3.1 Entidades .....	9
1.3.2 Principais normas a ter em conta para a implementação do método.....	11
1.3.3 Validação, verificação e acreditação.....	13
<b>II- Contraposição de métodos- relatório de estudo comparativo do método alternativo com o método de referência</b> .....	18
2.1 O método Symphony agar.....	18
2.2 O método de referência .....	20
2.3 Vantagens e desvantagens entre os dois métodos.....	21
2.4 Estudo de validação do método (Enquadramento geral).....	22
<b>III- Materiais e métodos</b> .....	25
3.1 Materiais.....	25
3.2 Rastreabilidade dos equipamentos no laboratório.....	26
3.3 Preparação e controlo de qualidade dos meios de cultura (ISO 11133:2014).....	28
A. Preparação.....	28
B. Armazenamento .....	29
3.4 Preparação do diluente.....	30

3.5	Preparação do meio Symphony agar .....	31
3.6	Controlo de qualidade em laboratório.....	33
3.7	Controlo de qualidade dos meios de cultura.....	36
3.8	Controlo de qualidade do meio de cultura Symphony .....	37
3.9	Amostragem.....	40
3.9.1	Alimentos utilizados somente no controlo de qualidade do método.....	40
3.9.2	Verificação de implementação (SIR).....	42
3.9.3	Verificação do produto alimentar (eBias) .....	42
3.10	Método para a contagem de bolores e leveduras.....	45
3.11	Verificação do método Symphony para uso em laboratório.....	47
3.11.1	Verificação de implementação.....	47
3.11.2	Verificação do produto alimentar .....	49
3.11.3	Contaminação do produto alimentar com MRC .....	51
<b>IV-</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>52</b>
4.1	Verificação de implementação (S <sub>IR</sub> ).....	52
4.2	Verificação do produto alimentar (eBias).....	58
<b>V-</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>74</b>
	Anexo A.....	74
	Anexo B.....	75
	Anexo C .....	76
	Anexo D.....	77
	Anexo E .....	78
	Anexo F .....	78
	Anexo G .....	79
	Anexo H.....	80
	Anexo I .....	81
	Anexo J .....	82



## Índice de figuras

Figura 1-Colónias caraterísticas da espécie <i>Aspergillus brasiliensis</i> no meio Symphony agar .....	6
Figura 2-Colónias caraterísticas da espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no meio Symphony agar.....	7
Figura 3- Colónias caraterísticas da espécie <i>Candida albicans</i> no meio Symphony agar .....	8
Figura 4- Resultados do relatório de validação do método alternativo por comparação com o método de referência .....	24
Figura 5- Estirpes de referência para realização do controlo de qualidade do meio de cultura (Ficha técnica do meio Symphony agar, BLOKAR Diagnostics, página 3) .....	37
Figura 6- Desvio padrão de reprodutibilidade mínimo obtido no estudo de validação (Relatório AFNOR, tabela 16, página 51- Anexo D).....	49
Figura 7- Esquema instrutivo para obter as diferentes gamas de contaminação para obter a amostra contaminada através de tubos de BHI com as lenticulas das espécies correspondentes .....	51

## Índice de tabelas

Tabela 1- Comparação das vantagens e desvantagens do método alternativo e do método de referência.....	21
Tabela 2- Manutenção do equipamento no laboratório Globalab.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Tabela 3- Registo dos lotes internos do meio Symphony produzidos em laboratório (em falta: data de validade após espalhamento- cerca de 1 mês, data de abertura e respetivo nº de amostra, data de fecho e respetivo nº de amostra, técnico que o produziu) .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Tabela 4- Tabela de produtividade dos lotes do meio Symphony produzidos em laboratório, todos conformes.....	37
Tabela 5-Cálculo do critério de precisão do método para contagem de bolores e leveduras.....	38
Tabela 6-Cálculo da reprodutibilidade do método para contagem de bolores e leveduras	38
Tabela 7-Cálculo da incerteza expandida do método para contagem de bolores e leveduras.....	39
Tabela 8- Ensaios realizados para o cálculo do SIR para <b>bolores e leveduras</b> .....	52
Tabela 9- Cálculo do SIR para os <b>bolores e leveduras</b> .....	53
Tabela 10- Ensaios realizados para o cálculo do SIR para as <b>leveduras</b> .....	54

Tabela 11- Cálculo do SIR para as <b>leveduras</b> .....	55
Tabela 12- Ensaios realizados para o cálculo do SIR para os <b>bolores</b> .....	56
Tabela 13- Cálculo do SIR para os <b>bolores</b> .....	57
Tabela 14- Cálculo do eBias para os <b>bolores e leveduras</b> (Vermelho: estímulo do crescimento de bolores e leveduras; Azul: inibição do crescimento de bolores e leveduras) (Anexo H).....	59
Tabela 15- Cálculo do eBias para as <b>leveduras</b> (Vermelho: estímulo do crescimento de bolores e leveduras; Azul: inibição do crescimento de bolores e leveduras) (Anexo I).....	62
Tabela 16- Cálculo do eBias para os <b>bolores</b> (Vermelho: estímulo do crescimento de bolores e leveduras; Azul: inibição do crescimento de bolores e leveduras) (Anexo J).....	65

## **Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos**

WDCM: World Data Center of Microorganisms.

ATCC: American Type Culture Collection.

ISO: International Standard Organization.

AFNOR: Association Française de Normalisation.

IPAC: Instituto Português de Acreditação.

SIR: Desvio padrão de reprodutibilidade intralaboratorial.

Aw: Atividade de água.

DRBC: Dichloran Rose-Bengal Cloramphenicol Agar.

MR: Material de Referência

MRC: Material de Referência Certificado.

BHI: Brain Heart Infusion (meio não seletivo)

# I-Introdução- Enquadramento teórico

## I.1 Microbiologia e Segurança Alimentar

Os problemas de saúde e segurança sempre ocuparam um lugar de destaque nas preocupações dos seres humanos, como se pode ver olhando para a escala de necessidades humanas de Maslow <sup>[1]</sup> O setor alimentar engloba ambos daí ser cada vez mais importante a Segurança Alimentar. A Segurança Alimentar consiste num conjunto vasto de fatores que vão desde a própria biologia dos alimentos até ao ato de consumo de forma a garantir uma alimentação saudável e segura sem comprometer consumidores e meio ambiente. A microbiologia apresenta um papel importantíssimo neste assunto. Esta área biológica assegura a qualidade dos alimentos através da análise de microrganismos indicadores e de possíveis microrganismos patogénicos que possam estar presentes e que podem ter variadas origens como a partir de processos de manufatura, conservação, transportes e até mesmo do meio ambiente. Investir na criação e implementação de novos métodos microbiológicos para a prevenção de doenças provenientes de alimentos é um dos passos mais importantes para segurança alimentar.

O crescimento dos microrganismos é afetado por variações nas condições físicas e químicas dos seus tipos de habitat naturais. A compreensão da influência dos fatores ambientais ajuda-nos a explicar a distribuição dos microrganismos na natureza e a definir as condições que permitam controlar (otimizar/inibir ou eliminar) a atividade microbiana no laboratório ou na indústria. Considera-se o pH, a disponibilidade da água e do oxigénio, a natureza e a concentração dos nutrientes, como sendo os fatores ambientais com um papel mais relevante no controlo do crescimento microbiano. <sup>[2]</sup>

## 1.2 Bolores e Leveduras

Os fungos são microrganismos eucarióticos. Os fungos podem ocorrer sob a forma leveduras, bolores ou como uma combinação de ambas as formas. Alguns fungos são capazes de causar doenças superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas ou alérgicas. [3]

### Leveduras

As leveduras são células solitárias que se reproduzem por gemulação. As leveduras são distinguidas com base na presença ou ausência de cápsulas, no tamanho e forma das células, no mecanismo de formação de células filhas, na formação de pseudo-hifas e hifas verdadeiras e na presença de esporos sexuais, em conjunto com dados fisiológicos. A morfologia é usada principalmente para distinguir as leveduras a nível de género, enquanto a capacidade de assimilar e fermentar várias fontes de carbono e utilizar nitrato como fonte de azoto é usada em conjunto com a morfologia para identificar espécies. [3]

As leveduras encontram-se abundantemente na natureza, particularmente em frutas, vegetais e cereais. O seu crescimento está limitado à superfície externa dos frutos são e intactos, não existindo internamente qualquer contaminação. Na indústria alimentar as leveduras desempenham um papel importante. São utilizadas no fabrico do pão e na produção de bebidas alcoólicas. No entanto, as leveduras podem ser também agentes de contaminação e deterioração dos alimentos devido à sua capacidade de crescer a temperaturas baixas e à sua tolerância a ambientes de stress físico-químicos, como são os utilizados na conservação de alimentos. Em produtos fermentados com levedura, a enumeração de levedura recuperável pode indicar em que estágio do processo de fermentação o produto se encontra. [4]

## Bolores

Os bolores são seres eucariotas, multicelulares e filamentosos e podem-se reproduzir por meio da divisão celular, de forma assexuada (mitose) ou de forma sexuada (meiose). O bolor consiste num conjunto de filamentos ramificados, chamadas hifas, que podem variar entre si, e esse conjunto de hifas é denominado o micélio. <sup>[5]</sup> As hifas que estão submersas degradam compostos orgânicos de enzimas extracelulares e absorvem nutrientes e também conseguem absorver água. Mais tarde, com a maturação do bolor, as hifas reprodutivas que estão à superfície produzem esporos assexuados ou sexuados que se dissipam pelo ar. A forma, o tamanho e a cor desses esporos são utilizados para classificar os bolores. <sup>[5]</sup>

## Bolores e leveduras nos alimentos

Os bolores e leveduras de origem alimentar são um grupo grande e vasto com centenas de espécies. A sua capacidade de atacar muitos tipos de alimentos deve-se, em grande parte, às suas exigências ambientais relativamente versáteis. Apesar da maioria dos bolores e leveduras serem aeróbios obrigatórios, isto é, necessitam de oxigénio para crescer, a sua necessidade ácido/alcalino para o crescimento é bastante ampla, o pH pode ir de 2 até superior a 9 (para a maioria das espécies o pH ótimo é de 5 a 6). O intervalo de temperatura também é bastante vasto, de 10°C a 35°C, sendo que algumas espécies são capazes de crescer acima ou abaixo deste intervalo. Os requisitos de humidade dos bolores de origem alimentar são bastante baixos, podem captar água da atmosfera ou do meio nutritivo, a maioria das espécies conseguem crescer a uma atividade de água (aw) de 0,85 ou menos, sendo capazes de crescer em alimentos desidratados ou entrar em estado de vida latente, já as leveduras geralmente necessitam de valores de aw maiores. <sup>[6]</sup> Tanto as leveduras como os bolores causam vários graus de deterioração e decomposição dos alimentos. Eles podem invadir e crescer em praticamente qualquer tipo de alimento a qualquer momento, sejam plantações como grãos, nozes, feijões e frutas nos campos antes da colheita e durante o armazenamento. Eles também crescem em alimentos processados e misturas de alimentos. A sua detetabilidade nos alimentos depende do tipo de alimento,

das espécies envolvidas e do grau de contaminação. [6]

O alimento contaminado pode estar levemente manchado, severamente manchado ou completamente decomposto, com o verdadeiro crescimento manifestado por manchas de podridão de vários tamanhos e cores, crostas feias, lodo, micélio branco tipo algodão ou bolor esporulado altamente colorido. Sabores e odores anormais também podem ser produzidos. [6]

Vários bolores de origem alimentar, e possivelmente leveduras, também podem ser perigosos para a saúde humana ou animal devido à sua capacidade de produzir metabolitos tóxicos conhecidos como micotoxinas. A maioria das micotoxinas são compostos estáveis que não são destruídos durante o processamento de alimentos ou na cozedura em casa. Mesmo que os organismos geradores não sobrevivam à preparação de alimentos, a toxina pré-formada ainda pode estar presente. Certos bolores e leveduras de origem alimentar também podem provocar reações alérgicas ou causar infeções. Embora a maioria dos bolores de origem alimentar não seja infecciosa, algumas espécies podem causar infeção, especialmente em populações imunocomprometidas. [6]

A ocorrência de fungos em alimentos geralmente está associada a práticas inadequadas de cultivo agrícola, armazenamento e transporte, aliado à negligência no que se vincula às práticas de higiene alimentar durante o preparo dos alimentos. [7]

Tanto o bolor quanto as leveduras podem contribuir para propriedades físicas, químicas e sensoriais negativas do produto alimentar. A contaminação de alimentos pode resultar em perdas económicas substanciais para o produtor, processador e consumidor. [6]

## Espécies utilizadas na implementação do método Symphony agar

Para a implementação do método alternativo, mais precisamente para proceder ao controlo de qualidade do meio e verificação do método, vamos utilizar as espécies de referência normalizadas, que são, para os bolores, *Aspergillus brasiliensis*, e para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*.

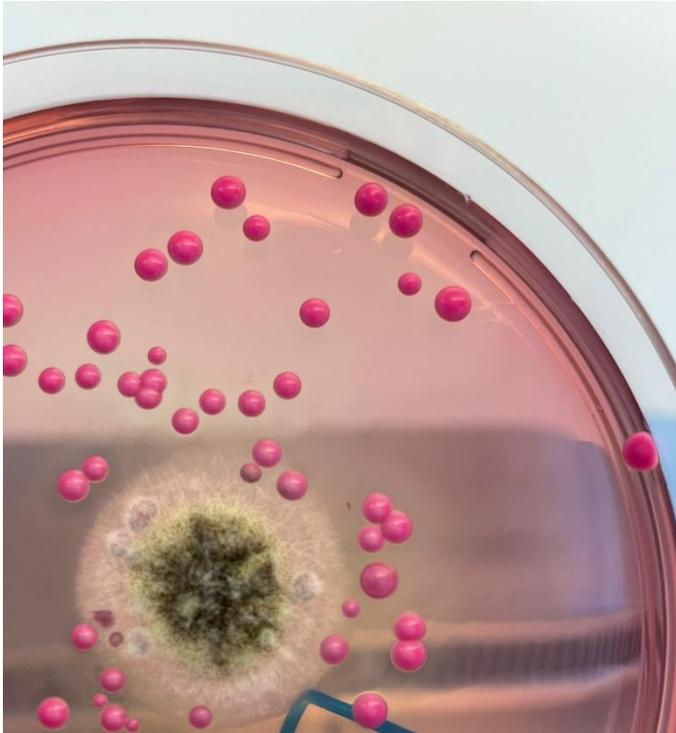
- *Aspergillus brasiliensis*

O género *Aspergillus* tem maior ocorrência em alimentos como os grãos e cereais, por exemplo, o arroz, feijão, milho, soja, aveia entre outros.

A espécie *Aspergillus brasiliensis* é um fungo e é uma das espécies mais comuns do género *Aspergillus*. É omnipresente no solo, um contaminante alimentar comum, e também é relatado regularmente em ambientes internos, como plantas industriais. A doença humana causada por *Aspergillus brasiliensis* é rara em comparação com outras espécies de *Aspergillus*, no entanto, quando é causado, pode resultar numa doença pulmonar grave chamada aspergilose. O *Aspergillus brasiliensis* é transmitido através da interação com os seus esporos e as infeções são consideradas oportunistas, ou seja, o organismo só causa doença quando o sistema imunológico já está comprometido.<sup>[8]</sup>

O *Aspergillus brasiliensis* é utilizado na indústria para produção de enzimas e metabolitos.<sup>[8]</sup>

A espécie é bastante versátil e consegue crescer em largos intervalos de temperatura, pH e atividade de água. Assim, apesar da temperatura ótima para o seu desenvolvimento ser entre 35 a 37°C, também pode crescer a temperaturas entre 6 e 47°C, relativamente ao pH pode crescer entre valores de 1,5 e 9,8, sendo o ideal 6,0 e, por último, a atividade de água mínima necessária para o seu desenvolvimento é 0,77 sendo o valor ideal 0,97.<sup>[9]</sup>



A espécie *Aspergillus brasiliensis*, utilizada como material referenciado para os ensaios, é identificada com o código WDCM 00053 e ATCC 16404, conforme o estudo de validação que vai de encontro com a norma ISO 11133: 2014. (Anexo A)

A cultura é caracterizada por colónias com um aspeto de algodão, inicialmente de cor branca e amarela mas passando depois para preto, como podemos observar na figura I.

Figura I-Colónias caraterísticas da espécie *Aspergillus brasiliensis* no meio Symphony agar

- *Saccharomyces cerevisiae*

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* pode ser encontrada naturalmente em vários nichos ambientais, mas é mais conhecida pelo seu papel na produção fermentativa, natural ou industrial, de pão, cerveja ou vinho, devido ao seu metabolismo fermentativo, resistência a elevados teores de açúcar e elevados teores de etanol e produção de compostos aromáticos.<sup>[10]</sup>

Apesar de ser, também, uma espécie com condições de crescimento de gama alargada, a temperatura ideal de crescimento encontra-se entre os 30 e os 35°C. Sendo um organismo acidófilo, cresce a pHs mais ácidos, desenvolvendo-se idealmente entre valores de pH de 4 a 6.<sup>[11]</sup>



A espécie *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada como material referenciado para os ensaios, é identificada com o código WDCM 00058 e ATCC 9763, conforme o estudo de validação que vai de encontro com a norma ISO 11133: 2014. (Anexo B)

As colónias caracterizam-se por ter uma forma redonda, com aspeto liso e limites bem definidos, que, no meio Symphony, apresentam uma cor rosa arroxeada, como podemos observar na figura 2.

Figura 2-Colónias características da espécie *Saccharomyces cerevisiae* no meio Symphony agar

- *Candida albicans*

A espécie *Candida albicans* é uma levedura oportunista que coloniza uma série de nichos ecológicos no hospedeiro humano, da cavidade oral ao estômago, trato gastrointestinal inferior e trato geniturinário, e durante a infecção tem a capacidade de invadir a corrente sanguínea e vários órgãos. A sua sobrevivência em microambientes tão diversos requer a capacidade de se adaptar a uma faixa extraordinariamente ampla de pH (de <2 a >10).<sup>[12]</sup> Pode crescer em várias formas morfológicas, incluindo forma de levedura unicelular, hifas alongadas e pseudo-hifas (multicelular).<sup>[12]</sup>



Esta levedura, utilizada como material referenciado para os ensaios, é identificada com o código WDCM 00054 e ATCC 10231, conforme o estudo de validação que vai de encontro com a norma ISO 11133: 2014. (Anexo C)

As colónias apresentam uma aparência rugosa, sem limites bem definidos e com uma cor rosa arroxeada, como podemos observar na figura 3.

Figura 3- Colónias características da espécie *Candida albicans* no meio Symphony agar

## I.3 Legislação

### I.3.1 Entidades

Para a implementação de um método em microbiologia é muito importante ter em conta toda a legislação, o que engloba, o laboratório, os técnicos de laboratório, o material de laboratório e o método em si, só assim irá existir confiança, credibilidade e autenticidade dos resultados emitidos. Para tal, também é necessário ter o conhecimento das organizações que produzem todas as normas, decretos-lei e afins que nos permitem produzir resultados viáveis, tanto a nível nacional como europeu.

- ISO

A ISO, Organização Internacional de Padronização, foi fundada em 1946 e é formada por representantes de 167 países, constituindo os organismos de normalização nacionais (órgãos membros ISO). A preparação de normas internacionais é, normalmente, levado a cabo por comités técnicos ISO. O seu objetivo principal é aprovar normas em todos os campos técnicos, como normas técnicas, de procedimentos e processos.<sup>[13]</sup>

- IPAC

O Instituto Português de Acreditação, IPAC, é o organismo nacional de acreditação, nos termos do Regulamento (CE) n.º 765/2008, e tem por missão desenvolver a atividade de acreditação, reconhecendo a competência técnica dos organismos de avaliação da conformidade. Atua, assim, como agente regulador de laboratórios de ensaio e de calibração, organismos de inspeção e organismos de certificação.<sup>[14]</sup> O IPAC é dirigido por um Conselho Diretivo e possui uma organização simplificada em que os serviços de apoio, nomeadamente serviços financeiros, de informática, de recursos humanos e logísticos, são subcontratados externamente. Para o desenvolvimento das suas atividades de acreditação o IPAC possui diversas comissões técnicas em que interatua com as partes interessadas e recorre a uma bolsa de avaliadores e peritos externos. Possui ainda uma Comissão Consultiva representativa das várias partes interessadas na atividade de acreditação e que supervisiona a imparcialidade da sua atuação, bem como providencia orientação estratégica.

<sup>[15]</sup> Iremos recorrer a esta organização para acreditação do método alternativo para a contagem de bolores e leveduras no laboratório Globalab.

- AFNOR

A AFNOR ou Associação Francesa de Normalização é uma entidade que projeta e implementa soluções baseadas em padrões voluntários em todo o mundo. O Grupo atende ao interesse geral nas suas atividades de padronização e presta serviços em setores tão competitivos como treinamento, informação profissional e técnica e inteligência, avaliação e certificação. <sup>[16]</sup> Congregando todos os principais agentes socioeconómicos, a AFNOR está atenta às suas necessidades e coopera estreitamente com os 25 gabinetes de normalização e demais entidades profissionais no desenvolvimento de um conjunto de normas que vão ao encontro dos seus objetivos estratégicos. É uma associação composta por 1480 membros e faz parte dos órgãos membros da ISO. <sup>[17]</sup>

O surgimento de métodos de testes microbiológicos rápidos no final da década de 1980 rapidamente colocou o problema da confiabilidade dos resultados relatados e sua correlação com os resultados dos métodos padronizados tradicionais. Atendendo às solicitações dos agentes económicos e das autoridades públicas, a AFNOR Certification criou assim um sistema de certificação independente destinado a demonstrar a fiabilidade e desempenho destes novos kits de teste, hoje denominados NF VALIDATION. O método alternativo que pretendemos implementar encontra-se inserido no grupo NF VALIDATION. A certificação NF VALIDATION confirma o desempenho analítico de métodos comerciais para um determinado alvo e um escopo definido, nas áreas de alimentos e água. Reconhecida na Europa e conhecida internacionalmente, esta certificação voluntária demonstra o compromisso dos fabricantes em fornecer kits de teste eficazes e de alta qualidade que são testados regularmente por um organismo independente, AFNOR Certification. <sup>[18]</sup>

### I.3.2 Principais normas a ter em conta para a implementação do método

A **NP EN ISO/IEC 17025:2018** define os requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, desta forma, torna-se a base e a referência internacional para que um laboratório possa exercer as suas funções e permite que os laboratórios demonstrem que operam com competência e geram resultados válidos, promovendo assim a confiança no seu trabalho, tanto a nível nacional como mundial. Esta norma também facilita a cooperação entre laboratórios e outras entidades gerando uma maior aceitação dos resultados entre os vários países. Assim, relatórios de análises acreditadas e certificados podem ser aceites de um país para outro, sem necessidade de outra análise, o que facilita a comercialização internacional. [19]

O laboratório Globalab segue e está acreditada para a NP EN ISO/IEC 17025:2018 para a realização de ensaios em águas, alimentos e agro-alimentar e efluentes líquidos

A norma **ISO 6887-** Microbiologia da cadeia alimentar- Preparação das amostras, suspensão inicial e diluições decimais para análise microbiológica tem como principais princípios, a preparação da suspensão inicial para obter uma distribuição tao uniforme quanto possível dos microrganismos existentes na amostra (porção do produto para análise) e a preparação, se necessário, de diluições de forma a reduzir o número de microrganismos por unidade de volume, para permitir, após incubação, a observação do seu crescimento ou não (no caso de tubos/frascos) ou contagem de colónias. É dividida em 4 partes, na primeira são dadas as regras gerais para a preparação da suspensão inicial e diluições decimais, a segunda, terceira e quarta partes apresenta as regras específicas para a preparação de amostras de carne e produtos derivados, para peixes e produtos derivados e para a preparação de todos os outros produtos excluindo leite e produtos lácteos, peixe e carne, respetivamente. [20]

É também especificado os tipos de diluentes que podem ser utilizados para a suspensão inicial e a preparação dos mesmos, estes são o diluente de sal peptonado, a água peptonada tamponada, a solução de peptona e o diluente de fosfato tamponado, Para a preparação das nossas amostras optou-se pelo sal peptonado. [20]

A norma **ISO 11133:2014 Amendment 1: 2018**- Microbiologia de alimentos, alimentos para animais e água-Preparação, produção, armazenamento e ensaios de desempenho do meios de cultura aplica-se a fabricantes, fornecedores e distribuidores de meios de cultura, assim como a laboratórios que produzem meios de cultura para uso próprio para a análise microbiológica de géneros alimentícios para consumo humano, análise microbiológica de alimentos para animais, todos os tipos de água destinada ao consumo ou utilização na produção alimentar e amostras do ambiente de produção de géneros alimentícios a alimentos para animais. A norma define quais os controlos a efectuar para cada tipo de meio de cultura, de acordo com as suas características e o fim a que se destina. <sup>[21]</sup>

Para assegurar o controlo de qualidade, os fabricantes de qualquer tipo de meios de cultura devem cumprir o definido na ISO 11133:2014 e a Amendment 1:2018 e deverão emitir um certificado de acordo com o controlo definido na norma, com os resultados esperados (critérios definidos na norma) e obtidos para os testes ou a avaliação de conformidade dos mesmos. O laboratório deverá avaliar se o fabricante cumpre e emite certificados de acordo com a ISO 11133:2014 e a Amendment 1. Para os laboratórios utilizadores finais do meio de cultura, a frequência da avaliação de desempenho dos meios de cultura deve ser por eles justificada, tendo em conta o grau de preparação de meios e o nível de controlo da qualidade implementado. Entende-se por grau de preparação se é feito através de componentes individuais ou meio desidratado, quantos passos de aquecimento (tais como dissolução do agar antes da distribuição, fusão, etc), se foram adicionados suplementos, etc. Se o meio de cultura for feito a partir de componentes individuais deverá ser efetuado um controlo da qualidade completo, de acordo com o definido na ISO 11133:2014 e da Amendment 1, a cada lote preparado. Se o meio de cultura for preparado a partir de uma fórmula comercial desidratada, deverá ser controlado quantitativamente na abertura do lote desidratado, de acordo com o controlo qualidade definido nos anexos E e F da norma ISO 11133:2014 e da Amendment 1 caso não esteja definido na norma técnica específica. Para os lotes de meio de cultura subsequentes preparados a partir do mesmo lote de meio desidratado, o controlo da qualidade a efectuar deverá ser qualitativo ou quantitativo de acordo com o procedimento definido pelo laboratório. <sup>[21]</sup>

Alguns fatores a ter em consideração para o nível de controlo a ser efetuado nos meios de cultura serão, a qualidade da água, os ciclos de autoclavagem, o pH e a verificação dos

equipamentos utilizados. O laboratório deve certificar-se de que as condições de armazenamento sejam mantidas conforme o definido em procedimento, normas de referência ou o recomendado pelos fabricantes e definir a validade para os meios de cultura preparados. O laboratório utilizador de meios de cultura prontos a usar, deve certificar-se de que as condições de armazenamento sejam mantidas conforme recomendado pelos fabricantes. Periodicamente devem ser efetuadas verificações, que poderão ser coincidentes com controlos de qualidade internos implementados na rotina laboratorial e ensaios de avaliação externa da qualidade, para avaliar possíveis alterações no transporte, armazenamento e fusão do meio sólido (se aplicável). Para os meios incompletos, cujo suplemento é adicionado no laboratório, deve ser realizado periodicamente, um controlo adicional que pode ser efetuado por avaliação dos registos ou por testes qualitativos que garantam que foi adicionado o suplemento correto. A frequência deste controlo deve ser definida e justificada pelo laboratório.<sup>[21]</sup>

### I.3.3 Validação, verificação e acreditação

São necessários 2 pontos essenciais antes de um método poder ser utilizado em laboratório, a sua validação e, posteriormente, a sua verificação.

- Validação

Para garantia da qualidade analítica temos como base a validação que, consiste no estabelecimento de características técnicas de um método e elaboração de uma evidência objetiva de que os requisitos de desempenho são alcançados, para o uso pretendido especificado. É importante haver uma descrição e caracterização detalhada do método de ensaio, de modo a que qualquer pessoa com preparação adequada o possa executar.<sup>[22]</sup>

Como referencial de validação do método Symphony, sendo este um método alternativo, recorreu-se à ISO 16140-2:2016: Microbiologia da cadeia alimentar- Validação de métodos: Protocolo para a validação de métodos alternativos (comerciais) comparados a um método de referência. Uma grande vantagem da implementação do método Symphony em laboratório é que este já foi, previamente, validado pela AFNOR em 2018, sendo que, todo o estudo e processo de validação foi desenvolvido num centro de investigação, com o

nome de ADRIA, Instituto Técnico de Agroindústria. A validação é um processo extenso e complexo, todo o método tem de ser aplicado a, pelo menos, 5 categorias diferentes de alimento e outras categorias para o qual possa ser utilizado, neste caso foram incluídas e testadas as seguintes categorias: Produtos prontos a consumir e prontos a aquecer; Produtos lácteos; Ovos e produtos do mar; Frutas e vegetais; Chocolates, pastelaria e confeitaria e, a outra categoria é a Alimentação animal. Foram analisadas um total de 214 amostras, sendo que pelo método de incorporação 99 amostras foram incubadas 54h e 111 amostras incubadas 72h e, pelo método à superfície foram incubadas 108 amostras 54h e 118 incubadas 72h. Devido à crescente necessidade de análises rápidas, convenientes e confiáveis, são utilizados, no mercado de análises microbiológicas, um grande número de kits comerciais. No entanto, os utilizadores desses kits precisam de garantias quanto ao seu desempenho. É por isso que a Certificação AFNOR desenvolveu um sistema de validação para estes métodos comerciais, a certificação de validação NF. Este sistema baseia-se num procedimento de certificação muito rigoroso para garantir que os desempenhos dos kits comerciais sejam equivalentes aos de métodos de referência padronizados ou estejam em conformidade com critérios de desempenho predefinidos. A certificação de validação NF confirma o desempenho analítico de métodos comerciais para um determinado alvo e um objeto de estudo definido, nas áreas de alimentos e água. Esta certificação possui uma marca coletiva europeia e um logótipo associado: a marca NF VALIDATION. Reconhecida na Europa e conhecida internacionalmente, esta certificação voluntária demonstra o compromisso dos fabricantes em fornecer kits de teste eficazes e de alta qualidade que são testados regularmente por um organismo independente, Certificação AFNOR.<sup>[18]</sup>

Esta certificação de validação NF irá simplificar bastante todo o processo para posterior uso em laboratório e, assim, apenas nos focaremos na verificação do método Symphony.

- Verificação

De acordo com a ISO 16140-3, a verificação de um método é a demonstração de que, o desempenho do método validado, nas mãos do técnico, está de acordo com as especificações determinadas no estudo de validação e que, é adequado ao seu propósito. Para tal, é necessário proceder a uma verificação de implementação, cujo objetivo é demonstrar que o profissional de laboratório consegue executar o método analítico corretamente e, a uma verificação do produto alimentar onde o técnico analista mostra que é capaz de testar os produtos alimentares que estão inseridos no âmbito do próprio laboratório. [22]

A verificação de implementação consiste em, o profissional de laboratório analisa um produto de uma categoria que foi, também, analisado na validação (para métodos qualitativos) ou qualquer produto de uma categoria que esteja incluído no âmbito da validação (para métodos quantitativos) e, que esteja também inserido no âmbito da aplicação em laboratório. O meio Symphony trata-se de um meio quantitativo, assim sendo, a verificação de implementação irá ser avaliada pelo cálculo do desvio padrão de reprodutibilidade intralaboratorial (SIR), o que equivale à determinação da incerteza técnica do método no laboratório em que está a ser implementado. Depois de escolhido o produto alimentar, realiza-se todo o procedimento do método tal como é descrito, sendo necessários no mínimo 10 amostras que têm de variar de lote, fornecedor ou gama de contaminação entre si. O limite aceitável do SIR obtido em laboratório deverá ser igual ou inferior ao valor do desvio padrão mais baixo calculado no estudo de validação do método.

A verificação do alimento, irá ser avaliada pelo eBias consiste em demonstrar que o técnico de laboratório consegue realizar o método corretamente com as matrizes alimentares frequentemente analisadas em laboratório. Para tal, o analista deve, selecionar um alimento desafiante, isto é, que incentive ou dificulte o crescimento dos microrganismos, por cada categoria incluída na gama de validação e que, também seja, regularmente, analisado em laboratório. Nesta fase, é importante que o tamanho/ quantidade do produto e da amostra coincidam com o que o que foi analisado no estudo de validação. [22]

Outro fator a ter em conta é se, na validação, foi incluída e testada alguma das seguintes categorias, Alimentos para animais, Amostras ambientais ( ex: locais de produção de alimentos) e/ou Amostras de produção primária (ex: superfícies de carcaças) e, se estas

categorias estão incluídas no dia-a-dia em laboratório. Se sim, então um produto de cada categoria deve ser incluído na verificação. Isto dá-nos um total de produtos  $\geq 6 + ((\text{Noutra categoria} + 1) \leq 4)$  para proceder à verificação do método. No caso do Globalab, das outras categorias, o método só se encontra validado para Alimentação animal e, uma vez que, não temos esta matriz de análise, não vamos proceder à sua verificação, pelo que, iremos ter, pelo menos, 6 produtos alimentares no nosso estudo. É fundamental que os produtos de cada categoria reflitam o espectro de amostras analisadas no laboratório e, devem, o mais possível, ser produtos com componentes como, propriedades naturais antimicrobianas, vitaminas, sabores e probióticos que, podem interferir com a deteção do microrganismo alvo.<sup>[22]</sup>

- Acreditação

Com a globalização crescente do mercado, torna-se cada vez mais importante transmitir confiança aos clientes e consumidores e assegurar a qualidade e a autenticidade dos resultados e, assim surgiu a necessidade de acreditar entidades e métodos. A atividade de acreditação consiste na avaliação e reconhecimento da competência técnica de entidades para efetuar atividades específicas de avaliação da conformidade (ex: ensaios, calibrações, certificações e inspeções). A atividade de acreditação está sujeita a legislação comunitária que obriga a um funcionamento harmonizado, verificado através de um sistema de avaliação pelos pares. Em consequência, cada Estado-Membro da UE (e EFTA- Associação Europeia do Comércio Livre) designou um único organismo nacional de acreditação, tendo em Portugal essa missão sido atribuída ao IPAC, conforme disposto no Decreto-lei n.º 23/2011, de 11 de Fevereiro.<sup>[23]</sup>

O IPAC é, pois, o organismo que, em Portugal, responde ao Regulamento (CE) n.º 765/2008, o qual contém diversas disposições quer para o País, quer para o IPAC, tendo sido notificado em consonância pelo Governo à Comissão Europeia.<sup>[23]</sup> Os laboratórios acreditados em Portugal são avaliados pelo IPAC não só aquando da concessão da acreditação, mas também regularmente, através de equipas de auditores experientes nomeados para esse efeito. Nesses acompanhamentos regulares efetuados pelo IPAC é avaliado o cumprimento continuado dos requisitos de acreditação, sendo que qualquer desvio significativo ou persistente pode resultar na suspensão ou anulação (parcial ou total) da acreditação do laboratório.<sup>[24]</sup>

O laboratório Globalab encontra-se acreditado pelo IPAC, para a NP/EN ISO/IEC 17025 e para mais de 80 métodos químicos, microbiológicos e de biologia molecular para a análise de águas, alimentos e amostras ambientais, garantindo a qualidade e fidedignidade dos resultados transmitidos ao cliente. Depois da verificação do método para a sua implementação e uso no laboratório, iremos recorrer à acreditação do método Symphony para a contagem de bolores e leveduras, para a contagem de bolores e para a contagem de leveduras. O pedido ao IPAC já foi realizado, no entanto a auditoria só está agendada para Novembro.

## **II- Contraposição de métodos- relatório de estudo comparativo do método alternativo com o método de referência**

### 2.1 O método Symphony agar

Devido aos requisitos de segurança alimentar, são necessárias análises microbiológicas frequentes em todas as etapas da produção de alimentos. Os métodos de referência, mais frequentemente descritos em normas, são geralmente caros em termos de mão-de-obra e têm um tempo de implementação relativamente longo (de vários dias a mais de uma semana).

Os requisitos em termos de segurança microbiológica são também muito rigorosos. Existe uma necessidade real de usar métodos mais rápidos e/ou mais fáceis de implementar do que os métodos de referência padronizados. Para atender às exigências dos laboratórios analíticos, os fabricantes desenvolveram e colocaram no mercado métodos comerciais que atendem às restrições da produção industrial; ou seja, mais simples, mais rápido e/ou mais econômico do que os métodos clássicos de referência. Eles são chamados de “métodos de análise alternativos”, métodos de análise rápida, ou mais comumente “kits”.<sup>[18]</sup>

O método Symphony agar trata-se de um método alternativo e quantitativo, designado para a contagem de bolores e leveduras em produtos alimentares para consumo humano e para consumo animal ou para o controle ambiental de áreas de produção ou para águas. Foi desenvolvido pelo grupo SOLABIA e é certificado pela NF Validation e validado, de acordo com a ISO 16140-2, por contraposição com o método de referência, a ISO 21527-1 e ISO 21527-2.

A escolha de peptonas, carboidratos e promotores de crescimento foram especialmente selecionados para otimizar o rápido crescimento dos bolores e leveduras. O Rose-Bengal (corante) é assimilado pelas leveduras o que facilita a sua enumeração pela coloração rosa. O sistema seletivo, associado com o pH do meio, assegura a inibição da maioria dos contaminantes bacterianos. O meio de cultura foi criado de modo a inibir a propagação do talo, pertencente à estrutura dos fungos, o que facilita a contagem após 54h de incubação e, também está adaptado corretamente para a contagem de esporos de bolores. O meio de

cultura não apresenta qualquer tipo de restrições. [25]

A composição do meio, para 1 litro de água destilada desionizada, consiste em:

- 10,0g de peptonas;
- 18,0g de glucose;
- 1,0g de promotores de crescimento;
- 1,0g de sistema seletivo;
- 15,5g de agar bacteriológico.

O pH ideal do meio, após esterilização, é de  $5,6 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . O meio de cultura já é comprado com todos os compostos juntos e desidratado e é fornecido pela Biokar Diagnostics.

A inoculação das amostras pode ser feita pelo método de incorporação ou pelo método de espalhamento à superfície. [25]

O método é independente da atividade de água do produto alimentar e as placas preparadas são incubadas aerobicamente, viradas para cima e, as colónias podem ser contabilizadas após 54 a 72h de incubação a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Caso seja necessário, deixar à luz do dia difusa durante 1 a 2 dias. [25]

No Symphony agar, as colónias características de leveduras apresentam uma coloração cor-de-rosa com limites bem definidos e as de bolores podem apresentar diferentes tamanhos e cores com limites irregulares. [25]

## 2.2 O método de referência

A ISO 21527:2008 veio substituir a ISO 7698:1990, a ISO 7954:1987 e a ISO 13861:1995 a fim de melhorar, simplificar e incorporar novas técnicas que possam ser utilizadas regularmente em laboratórios de segurança alimentar. <sup>[26]</sup>

No caso da ISO 21527 trata-se de uma implementação de um método horizontal para a contagem de bolores e leveduras, tanto em produtos com uma atividade de água superior a 0,95, como os ovos, a carne, os vegetais e os produtos lácteos (parte 1), bem como em produtos com uma atividade de água igual ou inferior a 0,95 como as compotas, bolos, especiarias e frutos secos (parte 2).

A norma aborda os requisitos necessários para a contagem de bolores e leveduras desde a composição e preparação do meio de cultura, o DRBC (Dichloran-rose bengal chloramphenicol agar), bem como a produtividade e seletividade do mesmo, o material necessário para a análise e o procedimento desde o processamento da amostra até à sua inoculação e incubação, terminando com a expressão de resultados e dos intervalos de confiança.

O DRBC, para 1 litro de água destilada desionizada, tem na sua composição:

- 5,0g de enzimas digestivas animais e de tecidos de plantas
  - 10,0g de D-Glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)
  - 1,0g Dihidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
  - 0,5g de Sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O)
  - 0,002g de Dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina)
  - 0,025g de Rosa bengal
- 12 a 15g de agar (dependendo da força do gel do agar)
  - 0,1g de Cloranfenicol

O pH ideal do meio, após esterilização, é de 5,6±0,2 a 25°C. O meio de cultura já é comprado já com todos os compostos e desidratado e é fornecido pela Oxoid.

As placas preparadas são incubadas aerobicamente, viradas para cima e, as colónias podem ser contabilizadas após 5 dias de incubação a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Caso seja necessário, deixar à luz do dia difusa durante 1 a 2 dias. [26]

As colónias características de leveduras são colónias cor-de-rosa com limites bem definidos, já as dos bolores são caracterizadas por ter um aspeto filamentososo, com um micélio branco e esporos negros. [26]

No relatório, é importante que contenha toda a informação necessária para uma completa identificação da amostra, o método de amostragem utilizado, o método de análise, os resultados obtidos e, se for o caso, algum detalhe ou incidente que possa ter influenciado os resultados. [26]

### 2.3 Vantagens e desvantagens entre os dois métodos

*Tabela 1 - Comparação das vantagens e desvantagens do método alternativo e do método de referência*

DRBC	Symphony
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mais barato</li> <li>✓ Incubação de 5 dias</li> <li>✓ Dependente da <math>a_w</math></li> <li>✓ Necessárias 2 credenciações (para a parte 1 e parte 2)</li> <li>✓ Necessário fazer a validação e posterior verificação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mais caro</li> <li>✓ Incubação de 54 a 72 horas</li> <li>✓ Independente da <math>a_w</math></li> <li>✓ Necessária apenas 1 credenciação</li> <li>✓ Estudo de validação previamente feito pela AFNOR</li> </ul>

## 2.4 Estudo de validação do método (Enquadramento geral)

O estudo comparativo de métodos faz parte do processo de validação realizado dentro do laboratório organizador. Inclui, no caso deste estudo, três partes:<sup>[27]</sup>

- Estudo de precisão relativa: Um estudo comparativo dos resultados do método de referência em comparação com os resultados do método alternativo, para uma gama de amostras diferentes de várias matrizes (natural e/ou artificialmente) contaminadas.
- Estudo do Perfil de Precisão: Um estudo comparativo dos resultados do método de referência com os resultados do método alternativo de amostras artificialmente contaminadas, usando réplicas de uma única matriz por categoria. Os dados são analisados usando a abordagem do Perfil de Precisão (AP).
- Um estudo de inclusão/exclusividade do método alternativo.

Para o estudo de validação, realizado pela AFNOR, foram utilizadas um total de 214 amostras, sendo que, pelo método de incorporação, foram consideradas 99 amostras (incubadas 54h) e 111 amostras (incubadas 72h), enquanto, pelo método de espalhamento, considerou-se 108 amostras (incubadas 54h) e 118 amostras (incubadas 72h). No estudo foram incluídas 6 categorias, cada uma subdividida em 3 tipos diferentes:<sup>[27]</sup>

### I. Produtos prontos a consumir e prontos a aquecer

- a) Prontos a consumir
- b) Prontos a aquecer
- c) Auxiliares culinários e molhos

### 2. Produtos lácteos

- a) Leites, cremes e sobremesas
- b) Queijos
- c) Leite em pó

### 3. Ovo produtos e produtos do mar

- a) Ovo produtos com aw fraca
- b) Ovo produtos com aw forte
- c) Produtos do mar cozidos e marinados

4. Frutas e vegetais
  - a) Preparações à base de frutas
  - b) Cereais
  - c) Produtos secos ou desidratados
5. Chocolates, pastelaria e confeitaria
  - a) Pastelaria
  - b) Bolos secos
  - c) Ingredientes
6. Alimentação animal
  - a) Matérias-primas
  - b) Produtos secos
  - c) Produtos húmidos

No estudo de validação, as amostras foram analisadas pelo método de referência e pelos dois protocolos do método alternativo onde houve uma diferenciação do tempo de incubação das amostras e do método de inoculação utilizado, portanto, dentro do método de espalhamento à superfície obtiveram resultados para amostras incubadas 54 horas e resultados para amostras incubadas 72 horas, assim como no método de incorporação. As amostras naturalmente contaminadas foram preferencialmente testadas, tendo sido consideradas cerca de 52,2% (incorporação-72h) e 53,4% (espalhamento-72h) mas também foi realizada uma contaminação artificial, através do uso de estirpes específicas de bolores e leveduras, ou contaminação cruzada das amostras, no total 90 amostras foram contaminadas. Foram utilizadas 35 espécies, 21 de bolores e 14 de leveduras, sendo que 52 e 58 amostras deram resultados viáveis pelo método de incorporação, a 54 e 72h, respetivamente, e, 57 e 63 amostras para o método de espalhamento, a 54 e 72h, respetivamente. [27]

Os resultados obtidos com um número de colónias inferior a 4 por placa não foram considerados e os resultados abaixo ou acima do limite de quantificação, por um e/ou outro método foram representados nos gráficos usando valores corrigidos mas não foram incluídos nos cálculos. Os resultados obtidos foram interpretados pelo método Bland-Altman, isto é, uma representação gráfica dos dados foi estabelecida para cada categoria testada e para todas as categorias juntas, uma linha de identidade (linha na qual os pontos

devem estar se ambos os métodos forem idênticos  $y=x$ ) é traçada para observar a distribuição dos pontos.<sup>[27]</sup>

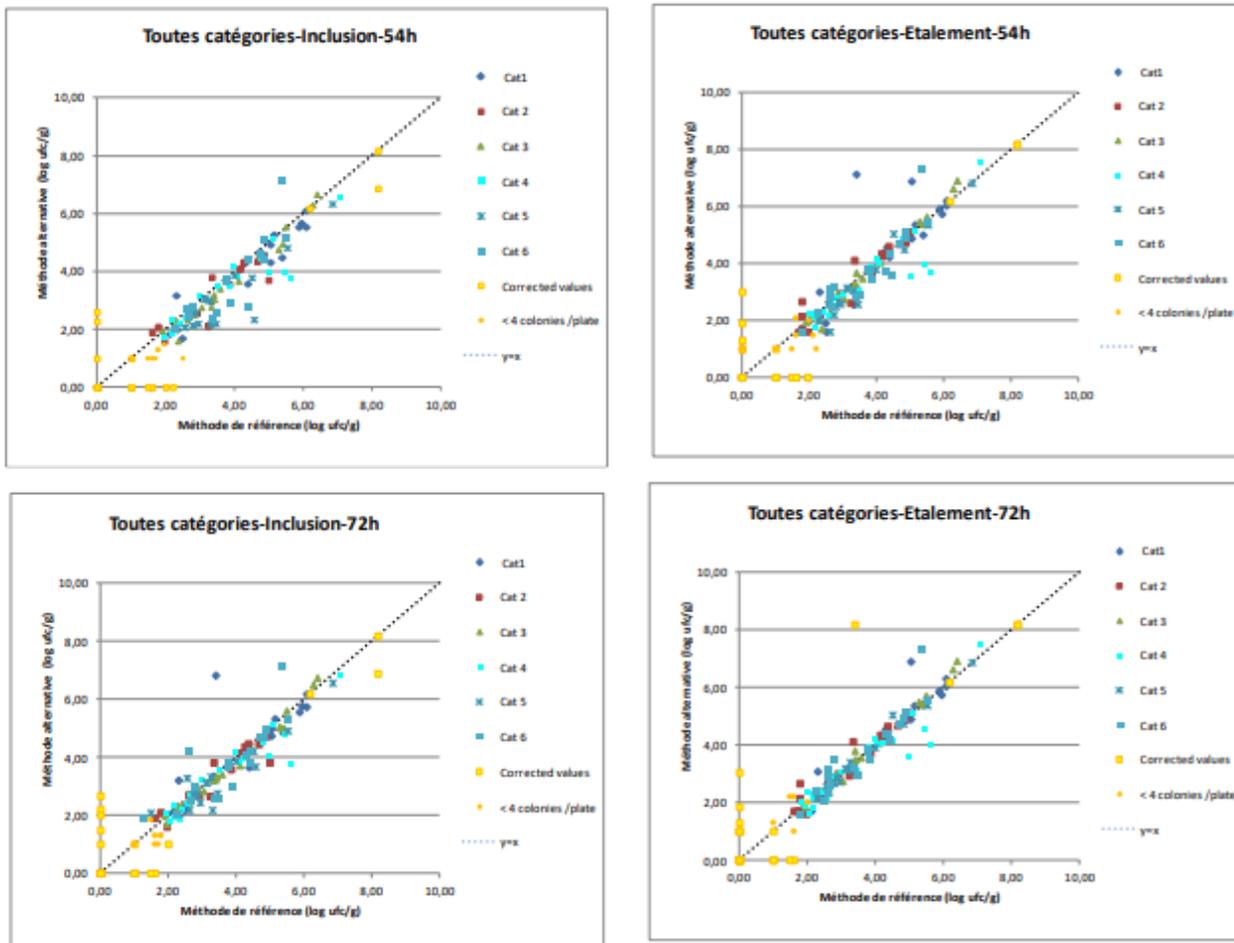


Figura 4- Resultados do relatório de validação do método alternativo por comparação com o método de referência

Podemos observar pelos gráficos da figura 4, sendo o método de referência o eixo x e o método alternativo o eixo y, que dentro de todas as categorias obteve-se valores bastante idênticos entre um método e outro, tanto por incorporação como por espalhamento à superfície e variando os tempos de incubação. Podemos concluir que no estudo de validação, os resultados foram bastante coesos e que o meio Symphony agar é realmente um bom método alternativo, tendo em conta as suas vantagens. Aplicá-lo em laboratório é uma mais-valia, pois poderemos emitir resultados em 3 dias.

### III- Materiais e métodos

#### 3.1 Materiais

Desde a preparação dos meios de cultura, diluente e meio seletivo, até à sua aplicação em laboratório, seguido do processamento das amostras, utilizou-se os seguintes materiais e equipamentos:

- Caldo de Triptona Sal desidratado 500g;
- Symphony agar desidratado 500g;
- Água destilada;
- Balança analítica;
- Frascos de vidro;
- Fita indicadora de esterilização;
- Autoclave;
- Frigorífico;
- Banho a 95°C;
- Placas de petri;
- Câmara de fluxo laminar;
- Utensílios previamente esterilizados;
- Sacos de amostragem/Sacos stomacher com ou sem filtro;
- Stomacher;
- Pipetas serológicas de 1 mL;
- Dilucups;
- Dilushaker;
- Espalhadores descartáveis;
- Estufa de 25°C;
- Varetas de vidro.

### 3.2 Rastreabilidade dos equipamentos no laboratório

A norma ISO 17025 define os critérios para manter a rastreabilidade dos equipamentos, assim, o laboratório deve executar e documentar um programa para manutenção, calibração e verificação do funcionamento do equipamento como parte do sistema de gestão. Relativamente à manutenção do equipamento essencial, deverá ser periódica e os intervalos devem ser determinados por fatores como, por exemplo, a taxa de utilização. Os respetivos registos detalhados devem ser guardados. [28]

Deve ter-se em atenção à possibilidade de contaminação cruzada, originada a partir do equipamento, assim, o equipamento descartável deve ser limpo e estéril quando apropriado e, o material de vidro reutilizável deve estar devidamente limpo e esterilizado quando apropriado. [28]

Tomamos como exemplo os aparelhos descritos na tabela 2, tendo em consideração que, a frequência deve ser baseada na necessidade, tipo e anterior comportamento do equipamento.

*Tabela 2- Manutenção do equipamento no laboratório Globalab*

<b>Tipo de aparelho</b>	<b>Requisitos</b>	<b>Frequência sugerida</b>	<b>Frequência aplicada</b>
<b>Frigoríficos (a), congeladores, estufas (b)</b>	Limpar e desinfetar as superfícies internas	(a) Quando necessário (por ex., de 3 em 3 meses) (b) Quando necessário (por ex., anualmente)	Todos são limpos e desinfetados semanalmente
<b>Banho de água</b>	Esvaziar, limpar, desinfetar e reencher	Mensalmente ou cada 6 meses se for usado um biocida	Mensalmente
<b>Câmara de fluxo laminar</b>	Revisão e verificação mecânica	Anualmente ou como recomendado pelo fabricante	Anualmente
<b>Balanças</b>	Limpeza Revisão	A cada utilização Anualmente	A cada utilização Anualmente

<b>Distribuidores de meio, equipamento volumétrico, pipetas e equipamento geral</b>	Descontaminação, limpeza e esterilização conforme apropriado	A cada utilização	A cada utilização
<b>Laboratório</b>	(a) Limpar e desinfetar as superfícies de trabalho (b) Limpar o chão, desinfetar esgotos e lavatórios (c) Outras superfícies	(a) Diariamente e durante utilização (b) Semanalmente (c) De 3 em 3 meses	(a) Diariamente e durante utilização (b) 2x por semana (c) Mensalmente
<b>Autoclave</b>	(a) Verificações visuais de borracha (vedação), limpeza/câmara de drenagem (b) Revisão completa (c) Verificação da segurança da câmara de pressão	(a) Regularmente, como recomendado pelo fabricante (b) Anualmente ou como recomendado pelo fabricante (c) Anualmente	(a) A cada utilização (b) e (c) De 6 em 6 meses
<b>Microscópio</b>	Manutenção completa	Anualmente	Anualmente
<b>Medidor de pH</b>	Lavar o eletrodo	A cada utilização	A cada utilização

No laboratório Globalab, todos os equipamentos possuem um código de referência, estão devidamente calibrados e são verificados periodicamente. Há um registo do controlo de qualidade onde, diariamente ou semanalmente, é confirmado as temperaturas dos frigoríficos e das estufas, com ajuda de DataLoggers (previamente calibrados) e, a cada ciclo do autoclave, também com ajuda de uma pilha, é feito o registo de temperatura para assegurar que se atingiu a temperatura de esterilização. O meio é rejeitado caso as temperaturas não estejam compreendidas entre 118°C a 124°C.

Todo o material, utilizado para a recolha e manipulação das amostras, é colocado em embalagens seladas onde é colocada uma etiqueta indicadora de esterilização e a data em que foi feito e, de seguida, é esterilizado por autoclavagem

A água destilada encontra-se dentro de um reservatório logo, para assegurar que esta se mantém pura é importante fazer um controlo da sua condutividade, sendo o ideal definido no laboratório Globalab um valor de 0,067  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Todos os outros materiais, proveniente de fornecedores, é importante manter uma rastreabilidade dos lotes, a data de chegada, o lote em uso (data de abertura e data de fecho), a data de validade, a ficha técnica e o certificado de qualidade correspondentes.

### 3.3 Preparação e controlo de qualidade dos meios de cultura (ISO 11133:2014)

Os meios de cultura disponibilizam aos microrganismos os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e multiplicação. Cada grupo de microrganismos tem necessidades nutricionais específicas e, como tal, os meios são escolhidos de modo a satisfazer essas necessidades. Um meio de cultura é uma solução aquosa dos nutrientes requeridos pelos microrganismos; contém água, uma fonte de energia e fontes de carbono, azoto, enxofre, fósforo, oxigénio, hidrogénio e vários iões metálicos. Alguns meios de cultura são ainda suplementados com sangue, soro, vitaminas, aminoácidos e nucleósidos, e outros ingredientes, de modo a permitir o crescimento de determinados grupos de microrganismos (meios enriquecidos). Outros meios, porém, são formulados para suprimir o crescimento dos microrganismos que não interessam ao fim em vista, permitindo o crescimento dos microrganismos que se desejam isolar (meios seletivos ou de enriquecimento). A incubação dos meios de cultura permite o desenvolvimento dos microrganismos que resulta na formação de colónias típicas (no caso dos meios sólidos) o que facilita a identificação dos mesmos. Neste trabalho os meios de cultura utilizados para a enumeração e identificação dos microrganismos pesquisados são de acordo com as normas de referência, para o qual o método é acreditado. <sup>[29]</sup>

#### A. Preparação

Quase todos os meios de cultura utilizados são preparados no laboratório, através de meios de cultura desidratados. Os meios de cultura desidratados são produzidos por laboratórios comerciais, sendo fornecidos em pó ou em grânulos, e a sua preparação

faz-se pela reidratação destes componentes, encontrando-se expressa toda a informação necessária no rótulo da embalagem. Pesa-se cuidadosamente o pó, ou grânulos, relativos ao volume que pretendemos obter e dissolve-se em água destilada com a ajuda do calor, no banho a 95°C, até dissolução completa e com frequente agitação. Nesta fase pode ser necessário ajustar o pH do meio para valores compatíveis com os das bactérias, que se encontra definido pelo fabricante para cada meio de cultura. No final distribui-se o meio de cultura em quantidades apropriadas, por recipientes adequados (tubos de ensaio ou frascos).<sup>[29]</sup>

É necessário esterilizar os meios de cultura, para evitar a presença de microrganismos contaminantes. A esterilização é feita por aplicação de calor húmido sob pressão, em autoclave, que permite temperaturas altas, um aquecimento mais rápido e uma grande penetração de calor. A esterilização dos meios de cultura faz-se por exposição ao vapor a 121°C e durante 15 minutos.<sup>[29]</sup>

#### B. Armazenamento

Após a esterilização, os meios de cultura que se pretendem utilizar são colocados na estufa a 45°C para, posteriormente, serem colocados em placas de petri. Quando não se pretende usar o meio de cultura de imediato, este deve ser conservado ao abrigo da luz, a uma temperatura de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  no período determinado pelo fabricante, evitando a sua desidratação. Todos os meios são guardados e rotulados com a identificação do meio e a data em que foi produzido.<sup>[29]</sup>

### 3.4 Preparação do diluente

O caldo Triptona-Sal, ou sal peptonado, é um diluente destinado à preparação de amostras de alimentos e cosméticos para análises microbiológicas. Também é usado para realizar diluições decimais. <sup>[30]</sup>

A triptona garante a reativação de microrganismos que foram submetidos a tratamentos subletais. O cloreto de sódio é uma solução isotónica. <sup>[30]</sup>

A sua composição, para 1 litro de água destilada desionizada é: <sup>[30]</sup>

- 1,0g de Triptona
- 8,5g de Cloreto de sódio.

O pH ideal do meio pronto para uso é  $7,0 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

A sua preparação consiste nos seguintes passos: <sup>[30]</sup>

- Dissolver 9,5g de meio desidratado (BK014) em 1 litro de água destilada desionizada;
- Agitar lentamente até dissolver completamente;
- Distribuir em tubos ou frascos;
- Esterilizar na autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos;
- Arrefecer o meio à temperatura ambiente.

Para efeitos de controlo de qualidade, o meio desidratado deve apresentar-se como um pó branco e homogéneo e o meio preparado deverá ser limpo e incolor. <sup>[30]</sup>

É com este diluente que iremos preparar as nossas amostras, ao pesar 10g e adicionando 90mL de Triptona-sal, obtendo assim a nossa solução inicial, a partir da qual faremos sucessivas diluições.

### 3.5 Preparação do meio Symphony agar

A preparação deste meio de cultura tem em conta os seguintes passos: <sup>[25]</sup>

- Dissolver 45,5g do meio desidratado (BK227) em 1 litro de água destilada desionizada;
- Levar a ferver lentamente, acompanhado com uma agitação constante, com ajuda de uma vareta, até dissolver completamente;
  - Espalhar em frascos;
  - Esterilizar na autoclave a 121°C por 15 minutos;
  - Deixar arrefecer e manter a 44-47°C no estado fundido.

É importante evitar o aquecimento excessivo do meio de cultura pois, irá produzir a desnaturação do agar devido a uma acidificação do pH e obteremos uma gelose muito macia.

<sup>[25]</sup>

Após a preparação e esterilização do meio, é importante avaliar a cor, o aspeto, a consistência e o pH, que devem estar de acordo com as indicações do fornecedor, caso não cumpra com os limites especificados o meio é rejeitado. <sup>[25]</sup>

Ao longo do nosso estudo utilizámos 2 lotes do meio desidratado para a produção do meio líquido para incorporação. No laboratório Globalab mantemos a rastreabilidade dos meios produzidos, das datas de produção, abertura e fecho e do pH e temperatura, após arrefecimento para uso posterior, tal como é regulamentado. A informação é organizada e armazenada como na tabela 3.

*Tabela 3- Registo dos lotes internos do meio Symphony produzidos em laboratório (em falta: data de validade após espalhamento- cerca de 1 mês, data de abertura e respetivo nº de amostra, data de fecho e respetivo nº de amostra, técnico que o produziu)*

<b>Data de preparação</b>	<b>Lote do meio</b>	<b>Data de validade</b>	<b>Volume de água destilada (mL)</b>	<b>Peso do meio desidratado (g)</b>	<b>pH/Temperatura</b>	<b>Consistência/Aparência</b>	<b>Controlo</b>
<b>25/02/2022</b>	56931	03/2026	2000	89	5,61/21,7°C	Normal	Ok
<b>03/03/2022</b>	56931	03/2026	1000	44,5	5,63/21,5°C	Normal	Ok
<b>04/03/2022</b>	56931	03/2026	1000	44,5	5,62/21,7°C	Normal	Ok
<b>08/04/2022</b>	56931	03/2026	1000	44,5	5,66/21,6°C	Normal	Ok
<b>07/06/2022</b>	56931	03/2026	2000	89	5,61/21,6°C	Normal	Ok
<b>24/06/2022</b>	56931	03/2026	1000	44,5	5,60/21,7°C	Normal	Ok
<b>14/07/2022</b>	56931	03/2026	2000	89	5,64/21,7°C	Normal	Ok
<b>15/07/2022</b>	62805	03/2026	1000	44,5	5,58/21,9°C	Normal	Ok
<b>05/08/2022</b>	62805	03/2026	1000	44,5	5,64/21,7°C	Normal	Ok

Deste modo, podemos concluir que o meio cumpriu os requisitos técnicos e os testes de qualidade favoravelmente, podendo ser utilizado nos ensaios que acompanham a implementação do método.

### 3.6 Controlo de qualidade em laboratório

A NP EN ISO 17025 define uma obrigatoriedade para a verificação e implementação de métodos normalizados para que estes possam ser aplicados em laboratórios, garantindo qualidade, confiabilidade e rastreabilidade nos resultados emitidos. É necessário, portanto, verificar certas características para demonstrar que o método tem o mesmo rigor e desempenho no laboratório no qual será implementado.

É importante definir parâmetros de controlo de qualidade para a implementação do método em si e parâmetros de qualidade para o meio de cultura a ser utilizado.

Para a implementação do método avalia-se os seguintes pontos, que vão de encontro com os critérios de verificação da ISO 16140-3, mas de um ponto de vista mais teórico temos:

- **Precisão:** Concordância entre os resultados independentes, obtidos por aplicação do mesmo método de ensaio, várias vezes em condições definidas. A precisão do método analítico pode ser expressa pelo desvio padrão ou pelo desvio padrão relativo (coeficiente de variação). A precisão pode ser avaliada através das funções repetibilidade, precisão intermédia ou variabilidade e reprodutibilidade. A reprodutibilidade refere-se à precisão avaliada, utilizando o mesmo método de ensaio sobre uma mesma amostra (ou amostras idênticas, fazendo variar, as condições de medição: diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos, épocas diferentes <sup>[31]</sup>

Para métodos microbiológicos, o estudo de precisão do método pode ser calculado através de

- Cálculo do critério de precisão do método
- Teste F
- Cálculo da Estimativa da Precisão, em condições de Precisão intermédia – reprodutibilidade intralaboratorial - e comparação com método normativo/referência

Comparação dos resultados obtidos para o critério de precisão do método em implementação no Globalab com os resultados obtidos no protocolo original de validação do método. Nos estudos de comparação acima referidos, a precisão e

critério de precisão deverão ter limites iguais ou mais exigentes no Globalab comparativamente aos estipulados no protocolo de validação original.<sup>[31]</sup>

O cálculo do critério de precisão do método é efetuado com base em duplicados de amostras reais ou contaminadas artificialmente, tendo um mínimo de 15 resultados. Para o cálculo do critério de precisão deverá ser utilizada a seguinte fórmula:<sup>[31]</sup>

Critério de precisão =  $3.27 \times R_{\text{médio}} (\text{LogA} - \text{LogB})$

A e B – valores obtidos nos ensaios em duplicado

- **Exatidão** é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro.<sup>[31]</sup>

Pode ser calculada através de:

- Teste T (Pared Test e Bias) e Linearidade (Teste de regressão linear),
- Ensaios em paralelo (seja metodologia alternativa ou metodologia de referência), com um critério de 90% concordância

Para as todas as matrizes estudadas o T calculado  $< T_{\text{Crítico}}$ , podendo assim concluir-se que os métodos não apresentam diferença significativa em termos de Exatidão. O Bias entre os dois métodos não deverá ser significativo em todos os níveis de contaminação. Comparando os valores obtidos para o Bias no Globalab com os valores de Bias do protocolo de validação original, não deverá haver diferenças significativas.<sup>[31]</sup>

- Utilização de MR e Participação em Ensaios Interlaboratoriais.

- **Participação em Ensaios interlaboratoriais ou na sua inexistência utilização de MR:** Na utilização de MR deverão ser seguidos os procedimentos e os critérios do laboratório ou fabricante na utilização desta ferramenta.

Para os Ensaios interlaboratoriais deverá ser feito pelo menos 1 ensaio interlaboratorial com desempenho satisfatório.<sup>[31]</sup>

- **Cálculo da Incerteza** (quando aplicável)  
Levantamento das fontes de incerteza quando o cálculo da estimativa de incerteza não é aplicável<sup>[31]</sup>
- **Qualificação dos analistas para o método**
- **Conclusão da adequação do método ao uso**

No geral, adotou-se os seguintes parâmetros de controlo de qualidade:

- Brancos;
- Sementeira em duplicado;
- Ensaio em paralelo;
- Controlo com material de referência;
- Controlo de qualidade dos meios de cultura
- Controlo de esterilidade
- Cartas de produtividade;
- Controlo externo (amostras cegas);
- Ensaio interlaboratoriais.

A realização de **brancos** demonstra que houve esterilidade ao longo de todo o processo de análise, os brancos são tratados igual às amostras e faz-se pipetando água estéril em vez de amostra.

A **sementeira em duplicado** (o mesmo operador) e os **ensaio em paralelo** (operadores diferentes) são utilizados para a avaliação dos operadores e para a avaliação de desempenho e aprendizagem de novos ensaios. Através dos duplicados iremos obter a precisão do método em laboratório e, através dos paralelos, iremos calcular a incerteza do método em laboratório.

O **controlo com material de referência** permite verificar a exatidão e desempenho dos ensaios e garantir a confiabilidade dos resultados. É utilizado para o controlo de qualidade dos meios de cultura e na validação e verificação de novos métodos em laboratório.

O World Data Center of Microorganisms (WDCM) foi criado como centro de dados da World Federation for Culture Collections (WFCC). O WDCM é um veículo para a rede de centros de pesquisa microbiana de vários tipos de micróbios. Serve, também, como fonte de informação para os clientes dos centros de pesquisa. É a partir deste centro de dados que obtemos o nosso material de referência certificado (MRC), consistindo em lenticulas de várias estirpes de microrganismos que nos permitem avaliar os parâmetros de qualidade através de ensaios de desempenho normalizados e avaliar os métodos de ensaio implementados em laboratório.<sup>[32]</sup>

### 3.7 Controlo de qualidade dos meios de cultura

O controlo de qualidade dos meios de cultura engloba os critérios de esterilidade, produtividade, seletividade e especificidade. Todos os meios de cultura, provenientes de fornecedores, vêm com um certificado de qualidade que é avaliado de acordo com os requisitos da norma ISO 11133:2014 e do laboratório. A cor, consistência, turvação, aspeto e pH também são observadas após a preparação dos meios. Para a execução dos testes de produtividade, seletividade e especificidade, o laboratório deve assegurar a utilização de, pelo menos, uma das estirpes referenciadas na ISO 11133:2014 e Amendment 1:2018, caso não esteja na norma técnica específica.

O **controlo de esterilidade** serve para verificar a ausência de contaminação de microrganismos no meio de cultura, assim por cada lote preparado em laboratório são incubados uma percentagem de tubos ou placas de acordo com o tempo e a temperatura do método referente ao microrganismo que pretendemos pesquisar. No fim não deverá haver alteração da cor, turvação, depósito ou gás nem crescimento de colónias.

A **produtividade** do meio de cultura refere-se ao nível de recuperação do microrganismo alvo no meio de cultura em condições definidas. Já a **seletividade** trata-se do nível de inibição de microrganismos não alvos no meio, mantendo as mesmas condições.

A **especificidade** é demonstrada pela capacidade de microrganismos não alvo não serem inibidos, mas apresentarem, no mesmo meio e nas mesmas condições, características visuais diferentes do microrganismo alvo.

### 3.8 Controlo de qualidade do meio de cultura Symphony

Na ficha técnica do meio Symphony são definidas as seguintes estirpes de referência para o controlo da seletividade e produtividade do meio, deste modo colocamos uma concentração conhecida de inóculo (microrganismos de referência) em placas de Symphony agar e incubamos por 3 dias a 25°C. Os ensaios são satisfatórios se a taxa de recuperação for igual ou superior a 50% para os microrganismos alvo e de 0 para outros microrganismos (figura 5).

Microorganisms		Growth (Productivity ratio : $P_R$ )
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WDCM 00058	$P_R \geq 50\%$
<i>Candida albicans</i>	WDCM 00054	$P_R \geq 50\%$
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	WDCM 00053	$P_R \geq 50\%$
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inhibited, score 0
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i>	WDCM 00003	Inhibited, score 0

Figura 5- Estirpes de referência para realização do controlo de qualidade do meio de cultura (Ficha técnica do meio Symphony agar, BLOKAR Diagnostics, página 3)

A seletividade e a produtividade são calculados a cada abertura de novo lote do meio desidratado, no nosso caso utilizámos dois, obtendo os seguintes valores

Tabela 4- Tabela de produtividade dos lotes do meio Symphony produzidos em laboratório, todos conformes.

Data	Lote interno	Lote meio desidratado	Microrganismo	Origem do MR	Diluições da solução-mãe	Nº de colónias meio seletivo	Nº de colónias meio não seletivo	PR
18/03/2022	25/02/2022	56931	<i>C. albicans</i>	Lentícula	171(-1) 17(-2)	81	88	0,92
18/03/2022	25/02/2022	56931	<i>A.brasiliensis</i>	Lentícula	70(-1) 7(-2)	99	104	0,95
18/03/2022	25/02/2022	56931	<i>S.cerevisiae</i>	Lentícula	194(-3) 19(-4)	90	85	1,06
25/07/2022	15/07/2022	62805	<i>C. albicans</i>	Lentícula	121(-1) 12(-2)	118	110	1,07
25/07/2022	15/07/2022	62805	<i>A.brasiliensis</i>	Lentícula	91(-1) 9(-2)	96	89	1,08
25/07/2022	15/07/2022	62805	<i>S.cerevisiae</i>	Lentícula	151(-3) 15(-4)	84	80	1,05

A taxa de produtividade, apresentada como PR na tabela 4, é calculada pela divisão do número de colónias do meio seletivo pelo número de colónias do meio não seletivo e, depois, convertida em percentagem. O limite aceitável regulamentado é igual ou superior a 50% para todas as estirpes de referência, sendo o valor ideal entre 80 e 120%. Para o meio de cultura Symphony, obteve-se valores entre 92% e 108%.

O controlo de qualidade do meio Symphony em laboratório apresentou resultados satisfatórios, mantendo as características desejadas, mantendo a esterilidade e obtendo valores de produtividade, seletividade e especificidade dentro dos valores regulamentados e, em particular, obtendo valores de produtividade bastante bons.

Relativamente ao controlo de qualidade do método em laboratório, temos, para a sementeira em duplicado (o mesmo operador), o cálculo do critério de precisão, que nos permite avaliar a precisão do método e detetar a ocorrência de erros acidentais. A fórmula é dada por: <sup>[31]</sup>

$$CP = 3,27 \times R_{\text{médio}} (\text{LogA} - \text{LogB}) \quad (\text{A e B valores obtidos nos ensaios em duplicado})$$

O meio Symphony foi implementado com o objetivo de obter 3 parâmetros distintos em laboratório, bolores, leveduras e bolores e leveduras, para tal iremos proceder ao cálculo de todas as fórmulas 3 vezes, obtendo valores para os bolores, valores para as leveduras e valores para os bolores e leveduras.

Para o critério de precisão, obteve-se os seguintes valores (tabela 5), as tabelas através das quais obtivemos o Rmédio, encontram-se como anexos A, B e C.

Tabela 5-Cálculo do critério de precisão do método para contagem de bolores e leveduras

	<i>Rmédio</i>	<i>Critério de Precisão</i>
<i>Bolores</i>	0,193	<b>0,631</b>
<i>Leveduras</i>	0,151	<b>0,495</b>
<i>Bolores e Leveduras</i>	0,142	<b>0,464</b>

Outro valor importante é a reprodutibilidade do método Symphony, que é dada pela fórmula  $R = 2,8 \times S_R$ , sendo o  $S_R$  a média dos desvios padrão da repetibilidade entre duplicados, em condições de precisão intermédia. Os resultados obtidos estão inseridos na tabela 6. O desvio padrão é obtido pela raiz quadrada do Rmédio<sup>[31]</sup>

Tabela 6-Cálculo da reprodutibilidade do método para contagem de bolores e leveduras

	$S_R$ (Desvio padrão)	Reprodutibilidade
Bolores	0,19	<b>0,528</b>
Leveduras	0,16	<b>0,434</b>
Bolores e Leveduras	0,14	<b>0,383</b>

A incerteza está relacionada ao erro associado, tendo em conta variáveis como, diferentes operadores, diferentes equipamentos, diferentes lotes, diferentes ensaios, entre outros, assim é fundamental o cálculo da incerteza para associar ao método e aos resultados emitidos. Este cálculo é seguido pela ISO 19036, tendo sido calculada a incerteza expandida, com base nos ensaios em paralelo, que se dá pela fórmula ( $2 \times S_R$ ), obtendo os seguintes resultados da tabela 7. <sup>[31]</sup>

Tabela 7-Cálculo da incerteza expandida do método para contagem de bolores e leveduras

	$S_R$ (Desvio padrão)	Incerteza operacional relativa
Bolores	0,13	<b>0,26</b>
Leveduras	0,22	<b>0,44</b>
Bolores e Leveduras	0,13	<b>0,27</b>

Os resultados destes 3 pontos de controlo de qualidade do método foram satisfatórios e de acordo com os limites do estudo de validação (Anexo D)

Outro controlo de qualidade obrigatório e fundamental são os controlos externos (ensaios interlaboratoriais) em simultâneo com as amostras cegas. <sup>[31]</sup> Em julho de 2022, foi enviada para o laboratório uma amostra com um valor de contaminação desconhecido para os técnicos de laboratório, mas conhecida pela entidade que a forneceu (INSA) e, foi tratada como as restantes amostras. Cada operador realizou os ensaios de acordo com o protocolo do método Symphony e aguardou os resultados que, posteriormente, foram enviados para avaliação. Os resultados do controlo são enviados sob a forma de Z-score, isto é, o número de desvios padrão pelos quais o valor de uma pontuação bruta está acima ou abaixo do valor médio do que está sendo observado ou medido.

A fórmula de cálculo é:

$$Z = \frac{X_i - X_{pt}}{S_{pt}}$$

$X_i$ - resultado do participante (expresso em  $\log_{10}$ )  
 $X_{pt}$ - valor alvo (mediana do consenso dos resultados (expresso em  $\log_{10}$ )  
 $S_{pt}$ - desvio padrão estabelecido para o ensaio (calculado pelo FEPTU)

Z= -1,99 a 1,99 Satisfatório

Z= -2 a -2,99 ou 2 a 2,99 Questionável

Z= <-3 a >3 Insatisfatório

Todos os operadores qualificados obtiveram um Zscore  $\leq 0,4$ , tanto para os bolores, como para as leveduras, como para os bolores e leveduras, isto indica, que a sua proximidade com o valor alvo do controlo externo foi bastante elevada. Este ensaio de controlo de qualidade considera-se bastante satisfatório.

### 3.9 Amostragem

A preparação das amostras é um ponto essencial para que todo o restante processo de análise seja bem efetuado e é fundamental, para garantir qualidade nos resultados, que as amostras sejam representativas do produto como um todo ou do lote, apesar de a distribuição dos vários microrganismos no alimento não ser uniforme.

Uma vez que o meio Symphony só se encontra validado para alimentos e para a alimentação animal e, tendo em conta que esta última categoria não se encontra no âmbito do laboratório Globalab, seguimos, então, as especificações da ISO 16140-3, selecionando um produto para a verificação de implementação e um produto por cada categoria incluída no estudo de validação e no âmbito do laboratório. É fundamental que os produtos de cada categoria reflitam o espetro de amostras analisadas no laboratório.

#### 3.9.1 Alimentos utilizados somente no controlo de qualidade do método

Numa fase inicial, apenas num contexto de experimentação, contrapusemos o método de referência ao método alternativo, no intuito de observar as características da gelose Symphony na recuperação dos bolores e das leveduras comparativamente ao DRBC e, para tal, selecionámos algumas matrizes alimentares, umas inseridas nas categorias selecionadas para a verificação do método e outras pertencentes a outras categorias, no entanto também representativas do espetro de amostras do laboratório. Estes produtos alimentares foram

incluídos para o estudo da precisão e da incerteza do método em laboratório, a fim de conseguir 20 a 30 resultados para obter valores bem fundamentados e coesos.

Assim foram selecionados os seguintes produtos alimentares que não foram incluídos no estudo de verificação:

- |                   |              |                      |
|-------------------|--------------|----------------------|
| - Croutons;       | - Agrião;    | - Papas de fruta;    |
| - Salada;         | - Espinafre; | - Salada 4 estações; |
| - Alface frisada; | - Abacaxi;   | - Sopa Juliana.      |

A maioria destes alimentos pertencem ao grupo de produtos hortofrutícolas e caracterizam-se por ter um elevado  $a_w \geq 0,95$ , sendo também crus, são portanto, alimentos muito propensos a deterioração, ideal para o crescimento de organismos e apresentam um prazo de validade curto, acrescentando o facto de serem embalados e processados. Depois do lado, oposto, escolhemos os croutons (cubos de pão de trigo tostado), com baixo  $a_w \leq 0,95$  (0,67 a 0,87), no entanto, contém na sua composição levedura, o que pode influenciar o crescimento destes microrganismos e apresentam um prazo de validade longo.

Para a verificação do método, escolheu-se amostras analisadas bastante regularmente, dentro do âmbito do laboratório e, com características diversas que possam facilitar ou impedir o crescimento de bolores e leveduras, seguindo assim o protocolo da ISO 16140-3.

### 3.9.2 Verificação de implementação (SIR)

Para a verificação de implementação (SIR), optou-se por um produto que testamos todos os dias no laboratório, tomate em rodela embalado, inserido na categoria de frutas e vegetais que se caracteriza por ter um pH entre 4 e 4,5 e um valor de  $a_w$  igual a 0,97, por ser cru e com um elevado teor de água é mais suscetível a deterioração e propenso ao crescimento de microrganismos, acrescentado o facto de ser processado (cortado em rodela), o que pode aumentar o nível de contaminação.

### 3.9.3 Verificação do produto alimentar (eBias)

Para a verificação do produto alimentar (eBias), é obrigatório adicionar ao nosso estudo, pelo menos, um produto desafiante por cada categoria. Temos, então, os seguintes efeitos da matriz a considerar: <sup>[22]</sup>

#### a) Características microbiológicas:

- Microbiota tecnológico – culturas de microrganismos e probióticos inoculados com microrganismos ( $10^6$  a  $10^9$  ufc/g);
- Grandes níveis de microrganismos (leite cru, carne moída de aves, amostras fecais);
- Alimento com microrganismos de deterioração, pois pode influenciar a recuperação e crescimento do microrganismo-alvo.

#### b) Características físico-químicas que afetam o crescimento:

- Composição – elevado teor de gordura, elevado teor de lecitina, elevada espessura e elevado teor de nutrientes;
- pH inferior a 4-5 (por exemplo: molhos);
- Potencial de oxidação-redução;
- $a_w$  inferior a 0,85 (por exemplo: farinha);
- Constituintes antimicrobianos e inibidores de crescimento;
- Estrutura física do alimento (por exemplo: viscosidade, solubilidade);
- Cor

Optou-se então pelas seguintes categorias e os seguintes alimentos:

1. Refeições compostas
2. Frutas e vegetais processados
3. Leite ou derivados
4. Bebidas não alcoólicas
5. Carne crua

Em cada categoria, inseriu-se mais que uma matriz alimentar, de forma a obtermos mais resultados e para avaliar de forma mais minuciosa a diferença de crescimento tanto de bolores como leveduras dos vários produtos dentro da mesma categoria.

#### Refeições compostas

Escolhemos para a primeira categoria, lombo de porco com batata e arroz que, sendo cozinhado e tendo bastantes componentes tem portanto um elevado teor de nutrientes e devido à carne e ao molho acrescenta-se o teor de gordura, tudo isto irá afetar o crescimento de bolores e leveduras. Foi, também, incluído no estudo o hambúrguer de grão-de-bico não cozinhado, que tem como características, um valor médio de atividade de água e pH superior a 5, contudo, tem na sua constituição farinha de trigo e especiarias e apresenta uma cor bastante amarela, todas estas características podem interferir com o desenvolvimento dos microrganismos.

#### Frutas e vegetais processados

Esta categoria é bastante propensa à contaminação por microrganismos por dois motivos, por serem produtos crus e naturais, provenientes do solo, fazendo parte da sua constituição um elevado teor de água e nutrientes ideais para o desenvolvimento de vários tipos de microrganismos, e por serem processados (por exemplo: cortados ou descascados). Como alimento desafiante, escolhemos a cebola em tiras, com pH entre 5 e 5,5 e com um  $a_w$  igual ou superior a 0,95, é um alimento com propriedade antioxidante e elevado teor de nutrientes, características que vão inibir o crescimento.

Depois escolhemos as favas congeladas, já prontas a cozinhar, que também é processado previamente e caracterizam-se pelo seu elevado teor de proteínas.

### Leite e derivados

Para esta categoria escolhemos um queijo fresco de vaca, que apresenta uma atividade de água entre 0,91 a 0,95, o que o torna muito suscetível ao aparecimento de bolores, e um pH de 4,5 a 5,5. Este valor de pH atinge-se após a fermentação que ocorre através de bactérias lácticas presentes no leite, a presença destas bactérias e o pH moderadamente baixo pode interferir com o aparecimento dos microrganismos de deterioração. A outra matriz alimentar foi o iogurte sólido de sabor a morango, com uma consistência coagulada e que, apresenta na sua constituição bactérias lácticas que são adicionadas após a pasteurização e permanecem “vivas”, estas têm um caráter probiótico e tornam o meio ácido dificultando o crescimento de outros microrganismos. O pH do iogurte ronda o valor de 4,5 devido ao processo de pasteurização do leite. Para os leites e derivados temos então, dois alimentos desafiantes

### Bebidas não alcoólicas

Esta categoria alimentar, é bastante analisada no laboratório Globalab, mais especificamente, os sumos à base de fruta. Os sumos apresentam uma atividade de água superior a 0,95 e um pH inferior a 5,0. Como alimento desafiante escolhemos o sumo de romã e sabugueiro, que é assim considerado devido à sua cor vermelha forte, à sua consistência polposa e às suas propriedades antioxidantes e elevado teores de açúcar. Dentro desta categoria, temos também, o sumo de melão, caracterizado também pela sua cor amarela esverdeada, elevados teores de açúcar e elevados teores de vitaminas.

### Carne crua

Para esta categoria, escolhemos a salsicha fresca e a espetada de porco como alimentos desafiantes, que apresentam características como um elevado teor de gordura e proteínas, e tem na sua composição nutrientes e aditivos alimentares para preservar o produto mais tempo.

A salsicha fresca apresenta um valor de pH de cerca de 5,9 e uma atividade de água de 0,91. Já a espetada de porco, apresenta valores de pH entre 5,8 e 6,0 e uma atividade de água, também acima de 0,90.

Todas as amostras foram preparadas de forma igual ao estudo de validação, assim para cada ensaio foram pesadas 10g do produto alimentar e 90mL do diluente, neste caso o caldo

triptona sal, previamente preparado e esterilizado no laboratório, perfazendo assim 100mL de amostra num saco com filtro.

### 3.10 Método para a contagem de bolores e leveduras

Inicialmente retiramos a gelose Symphony, previamente preparada e esterilizada, da estufa a 44°C, para a inoculação das amostras em análise poderemos recorrer à inoculação à superfície ou à inoculação por incorporação, contudo, é importante ter em conta que, o método de inoculação à superfície irá facilitar uma maior exposição das células ao oxigénio atmosférico e evita a inativação térmica dos propágulos dos fungos (os esporos), o que irá resultar num número superior de colónias, comparativamente ao método por profundidade.

[25]

A inoculação à superfície consiste nos seguintes passos: [25]

1. Espalhar o meio de cultura em placas de Petri;
2. Deixar solidificar numa superfície fria e plana;
3. Secar as placas numa incubadora com as tampas parcialmente removidas, neste caso utilizou-se a câmara de fluxo laminar;
4. Transferir 0,1 mL da amostra em análise e das suas seguintes diluições para a superfície das placas preparadas anteriormente;
5. Para obter números inferiores de colónias, inocular 1 mL da suspensão-mãe à superfície de 3 placas de Petri;
6. Espalhar o inoculado pela superfície da placa com uma ansa estéril ou com um espalhador;
7. Incubar as placas com a parte de baixo para cima a 25°C por 54 a 72h.

A inoculação por incorporação tem em conta os seguintes passos: <sup>[25]</sup>

- I. Transferir 1 mL da suspensão-mãe e das diluições seguintes para uma placa de Petri vazia e estéril;
2. Colocar, aproximadamente, 15 mL do meio líquido derretido por placa;
3. Homogeneizar bem, através de movimentos circulares, e deixar secar numa superfície plana e fria;
4. Incubar as placas com a parte de baixo para cima a 25°C por 54 a 72h.

Em laboratório, iremos dar prioridade ao método por espalhamento à superfície dada as matrizes alimentares e os limites de quantificação, só aplicando o método por incorporação caso seja requisitado pelo cliente. Já relativamente ao tempo de incubação, iremos apenas proceder à contagem das colónias às 72 horas, uma vez que o horário após 54 horas de incubação não é compatível com o nosso horário de trabalho.

No entanto, realizou-se um pequeno estudo comparativo, relativamente ao tipo de inoculação, concluindo que o crescimento de bolores e leveduras é idêntico diminuindo ligeiramente no método por incorporação. Comparou-se também ao método de referência, contudo, não contrapomos os métodos ao longo de todo o processo de verificação, pois o método do DRBC não se encontra verificado nem acreditado no laboratório Globalab, logo não seria uma comparação bem sustentada, pelo que não sera incluído neste relatório de estudo.

### 3.1.1. Verificação do método Symphony para uso em laboratório

Como já foi referido no ponto 1.4.3, a ISO 16140-3 define um protocolo para a verificação de métodos de referência e métodos alternativos validados num laboratório, isto é, quando um laboratório demonstra que pode executar o método validado de forma satisfatória. A norma define os procedimentos conforme o método seja quantitativo ou qualitativo, para tal, e sendo o Symphony um método quantitativo, são necessários 2 passos antes de aplicarmos o método no nosso laboratório, a verificação de implementação, que consiste em demonstrar que o profissional de laboratório executa o método corretamente e compara os resultados obtidos com os resultados do método de validação, e a verificação do produto alimentar, que demonstra que o utilizador é capaz de testar os produtos alimentar incluídos no objetivo da aplicação em laboratório, isto é, alimentos que estejam incluídos no âmbito da validação e que são regularmente analisados pelo técnico em laboratório.

Atendendo às necessidades dos clientes, o método foi verificado e será acreditado para somente bolores, para somente leveduras e para bolores e leveduras conjuntamente, obtendo um total de 3 parâmetros em laboratório.

#### 3.1.1.1 Verificação de implementação

A verificação de implementação foi avaliada pelo desvio padrão de reprodutibilidade intralaboratorial (SIR), ou seja, calculou-se o grau de concordância entre os resultados obtidos em laboratório, sob condições variadas.

Deste modo, selecionou-se qualquer produto, de qualquer categoria, que esteja incluído no âmbito da validação do método, mas não necessariamente estudado na validação e que seja frequentemente analisado em laboratório. São necessários, no mínimo, 10 resultados para podermos calcular o nosso desvio padrão, portanto, são necessárias, no mínimo, 10 amostras mas que variem entre si, seja no lote, no produtor, ou nas gamas de contaminação e todas realizadas em duplicado. Neste caso será, então, o tomate em rodela.

O nosso SIR terá que ser igual ou inferior ao dobro do desvio padrão de reprodutibilidade mais baixo obtido no estudo de validação. Através da informação da ISO 16140-3, realizou-se o seguinte esquema sobre como realizar estes ensaios e calcular o SIR:

Selecionar um produto alimentar de uma categoria listada dentro do âmbito da validação do método



1 produto alimentar (Item frequentemente testado no laboratório) = 10 amostras

- ≠s lotes,
- ≠s produtores
- ≠s gamas de contaminação
- outras diferenças



Paralelos

Suspensão-mãe  
Resultado  
(xA)



$$y_A = \log(x_A)$$

A Suspensão-mãe B  
A Resultado B  
(xB)



$$y_B = \log(x_B)$$

1. Cálculo da diferença absoluta ao quadrado de cada uma das amostras:

$$|y_A - y_B|^2$$

2. Soma de todos os valores obtidos da diferença absoluta ao quadrado

3.

$$s_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

Limite aceitável:  $SIR \leq 2 \times (SR \text{ mais baixo determinado no estudo de validação})$

Reproducibility standard deviation (sR)	0,100	0,194	0,123

Figura 6- Desvio padrão de reprodutibilidade mínimo obtido no estudo de validação (Relatório AFNOR, tabela 16, página 51- Anexo D)

De acordo com o relatório de validação do método (figura 6), podemos observar que o desvio padrão de reprodutibilidade mais baixo obtido foi de 0,100 pelo que o nosso limite aceitável para a verificação do método será igual ou inferior a 0,200.

### 3.11.2 Verificação do produto alimentar

Para a verificação do produto alimentar, recorreu-se ao eBias, isto é a precisão estimada do método em laboratório. Cada alimento foi contaminado com o material de referência em 3 gamas de contaminação diferentes,  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^5$  e cada análise é realizada em duplicado (o mesmo operador).

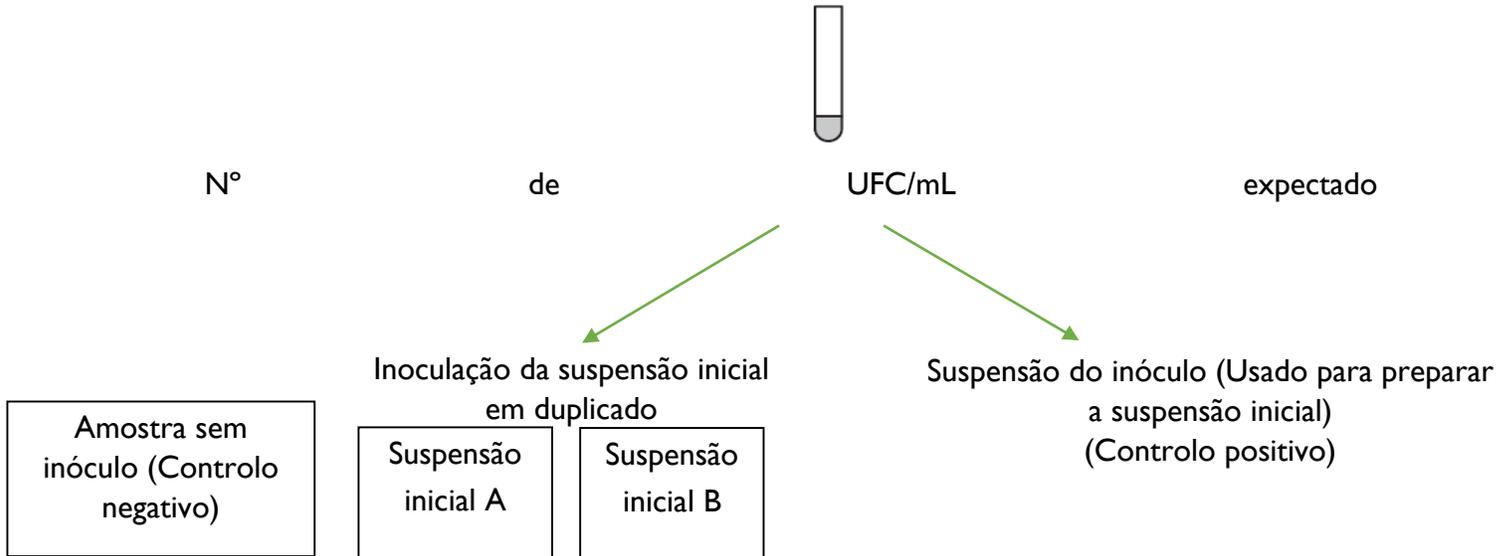
Para os ensaios do cálculo do eBias temos, a suspensão do inóculo nos 3 níveis de contaminação, que consiste em inocular somente as espécies de bolores e leveduras no meio, sem qualquer matriz alimentar, para observar como é que o crescimento dos microrganismos ocorreria normalmente, estes valores vão servir de controlo positivo. Depois temos o produto alimentar contaminado com o material de referência em 3 níveis, que nos mostra se o alimento causou alguma inibição ou propensão ao crescimento das espécies, e para o controlo negativo, analisou-se o produto alimentar sem qualquer tipo de contaminação artificial, para perceber o nível de bolores e leveduras presentes no alimento naturalmente, caso exista.

De acordo com as informações da ISO 16140-3 realizou-se um esquema explicativo para a realização da verificação do produto alimentar.

Selecionar 1 produto alimentar desafiante para cada categoria (5 categorias)

Contaminar artificialmente em 3 níveis diferentes:

- ≠ amostra ou ≠ lote do mesmo produto para cada nível de contaminação
- Cada nível em duplicado



Para o eBias, para cada produto alimentar fez-se a diferença absoluta entre o logaritmo dos resultados do controlo positivo e o logaritmo dos resultados da amostra artificialmente contaminada. Para a verificação do produto alimentar ser correta, esta diferença tem que ser inferior ou igual a 0,5.

### 3.1.1.3 Contaminação do produto alimentar com MRC

Para estes ensaios utilizou-se o material de referência inserido, que também foi usado nas características de desempenho do meio. Assim temos, para os bolores, a espécie *Aspergillus brasiliensis* (WDCM 00144), e para as leveduras variou-se entre as espécies *Candida albicans* (WDCM 00054) e *Saccharomyces Cerevisiae* (WDCM 00058). Numa primeira fase, ressuspendemos as lenticulas das espécies acima mencionadas em tubos de BHI (Brain-Heart Infusion) de 5mL, que se trata de um meio liquido ideal para a cultura de vários tipos de microrganismos, de seguida incubou-se a 25°C e foi a partir destes tubos que contaminámos as nossas amostras.

Tanto para a verificação de implementação como para a verificação do produto alimentar usou-se diferentes gamas de contaminação,  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^5$ . Desta forma, tivémos que determinar qual o nível de contaminação presente nos tubos de BHI, de onde partimos inicialmente, pipetando diretamente do tubo de cada uma das espécies 0,1mL para uma placa do nosso meio de cultura (método de espalhamento), chegando à conclusão que estes se encontrava na gama de  $10^7$  (ufc/mL). Por último, procedemos ao seguinte esquema (figura 7) para saber a quantidade de inóculo a utilizar para contaminar as nossas amostras nas gamas de contaminação pretendidas.

**BHI**    *Candida albicans*/    *Saccharomyces Cerevisiae*/    *Aspergillus brasiliensis*

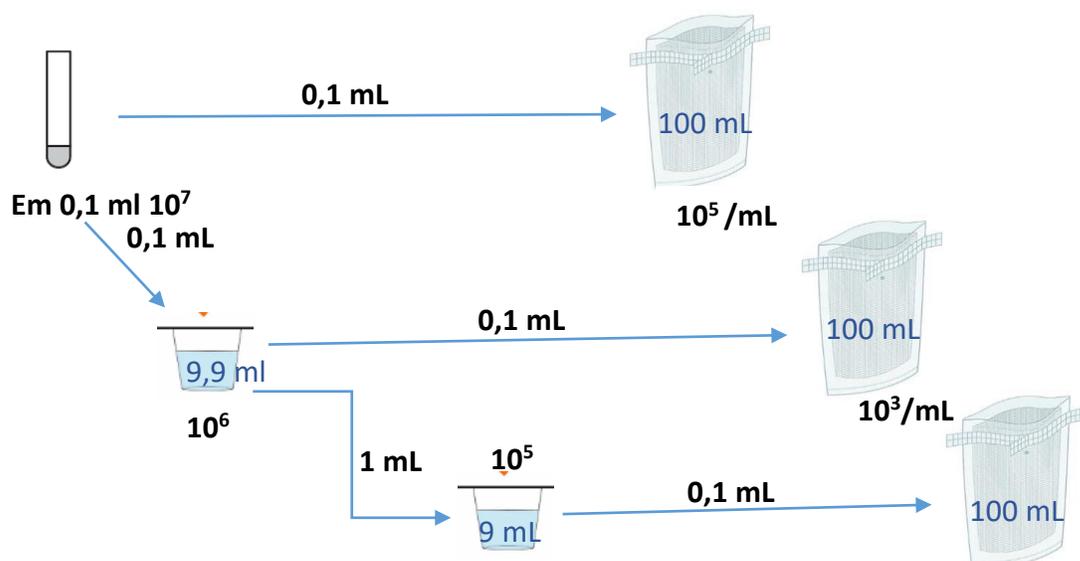


Figura 7- Esquema instrutivo para obter as diferentes gamas de contaminação para obter a amostra contaminada através de tubos de BHI com as lenticulas das espécies correspondentes

## IV-Resultados e discussão

### 4.1 Verificação de implementação ( $S_{IR}$ )

Ao longo dos dias fomos variando a gama de contaminação do tomate e todos os lotes foram diferentes de amostra para amostra, analisou-se um total de 15 amostras e todas elas foram realizadas em duplicado e paralelo.

Tabela 8- Ensaios realizados para o cálculo do SIR para **bolores e leveduras**

Amostra (N)	Nível de contaminação esperado cfu/g	Resultado A ( $x_{iA}$ )	Resultado B ( $x_{iB}$ )
8974	$10^3$	795	1200
8974	$10^5$	67500	74000
10301	$10^3$	3000	1700
10352	$10^2$	200	400
10629	$10^3$	200	300
10629	$10^5$	2600	2400
10717	$10^5$	250000	260000
10902	$10^5$	700	400
11913	$10^3$	1050	1100
13022	$10^5$	175000	180000
13318	$10^5$	10000	12000
13552	$10^5$	65000	72000
13651	$10^5$	140000	130000
14090	$10^5$	82500	120000

Log <sub>10</sub> Resultado A	Log <sub>10</sub> Resultado B	Diferença absoluta	Diferença de quadrados
		$ y_{iA} - Y_{iB} $	$ y_{iA} - Y_{iB} ^2$
$Y_{iA} = \log_{10}(X_{iA})$	$Y_{iB} = \log_{10}(X_{iB})$		
2,90	3,08	0,1788	0,0320
4,83	4,87	0,0399	0,0016
3,48	3,23	0,2467	0,0608
2,30	2,60	0,3010	0,0906
2,30	2,48	0,1761	0,0310
3,41	3,38	0,0348	0,0012
5,40	5,41	0,0170	0,0003
2,85	2,60	0,2430	0,0591
3,02	3,04	0,0202	0,0004
5,24	5,26	0,0122	0,0001
4,00	4,08	0,0792	0,0063
4,81	4,86	0,0444	0,0020
5,15	5,11	0,0322	0,0010
4,92	5,08	0,1627	0,0265

Legenda: xA - n<sup>a</sup> de colónias obtidas pelo primeiro operador (ufc/g)  
 xB - n<sup>o</sup> de colónias obtidas pelo segundo operador (ensaio em paralelo) (ufc/g)

Apenas foram utilizadas para o cálculo 14 amostras, foram rejeitados todos os resultados com um número de colónias de bolores e leveduras inferiores a 10 (na placa) e a amostra 9036 do dia 2 de Junho não apresenta um ensaio em paralelo, pelo o que, também, foi rejeitada. (Anexo E)

Tabela 9- Cálculo do SIR para os **bolores e leveduras**

Soma $ y_iA - Y_iB ^2$	0,3129
N	14
Soma/(2*N)	0,0112
SiR= $\sqrt{(0,0141)}$	<b>0,105716232</b>
SR do estudo de validação	0,1
2 * Sr	0,20000
SiR < 2 * Sr	0,11 < 0,2

Para os bolores e leveduras, através dos resultados obtidos na tabela 8 e seguindo a fórmula de cálculo do SIR, obtivemos um valor de desvio padrão de reprodutibilidade intralaboratorial de 0,106, como podemos observar na tabela 9, pelo o que estamos dentro do limite aceitável e conseguimos um valor igual ao desvio padrão do estudo de validação( Anexo D).

Assim podemos considerar satisfatório a verificação da implementação do método Symphony para a contagem de bolores e leveduras.

Tabela 10- Ensaios realizados para o cálculo do SIR para as leveduras

Amostra (N)	Nível de contaminação expetado cfu/g	Resultado A ( $x_{iA}$ )	Resultado B ( $x_{iB}$ )
8974	$10^3$	795	1200
8974	$10^5$	67500	74000
10301	$10^3$	3000	1600
10352	$10^2$	200	400
10629	$10^3$	200	300
10629	$10^5$	2450	2200
10717	$10^2$	225000	260000
10902	$10^5$	700	400
11913	$10^5$	800	900
13022	$10^5$	175000	180000
13318	$10^5$	10000	12000
13552	$10^5$	65000	72000
13651	$10^5$	140000	130000
14090	$10^5$	82500	120000

Log <sub>10</sub> Resultado A	Log <sub>10</sub> Resultado B	Diferença absoluta	Diferença de quadrados
		$ y_{iA} - Y_{iB} $	$ y_{iA} - Y_{iB} ^2$
$Y_{iA} = \log_{10}(X_{iA})$	$Y_{iB} = \log_{10}(X_{iB})$		
2,90	3,08	0,1788	0,0320
4,83	4,87	0,0399	0,0016
3,48	3,20	0,2730	0,0745
2,30	2,60	0,3010	0,0906
2,30	2,48	0,1761	0,0310
3,39	3,34	0,0467	0,0022
5,35	5,41	0,0628	0,0039
2,85	2,60	0,2430	0,0591
2,90	2,95	0,0512	0,0026
5,24	5,26	0,0122	0,0001
4,00	4,08	0,0792	0,0063
4,81	4,86	0,0444	0,0020
5,15	5,11	0,0322	0,0010
4,92	5,08	0,1627	0,0265

Legenda:  $x_A$  - n<sup>a</sup> de colónias obtidas pelo primeiro operador (ufc/g)  
 $x_B$  - n<sup>o</sup> de colónias obtidas pelo segundo operador (ensaio em paralelo) (ufc/g)

Apenas foram utilizadas para o cálculo 14 amostras, foram rejeitados todos os resultados com um número de colónias de leveduras inferiores a 10 (na placa) e a amostra 9036 do dia 2 de Junho não apresenta um ensaio em paralelo, pelo o que, também, foi rejeitada.(Anexo F)

Tabela 11- Cálculo do SIR para as leveduras

Soma $ y_{iA} - Y_{iB} ^2$	0,3040
N	14
Soma/(2*N)	0,0109
SiR= $\sqrt{0,0141}$	<b>0,104190189</b>
SR estudo validade	0,1
2 * Sr	0,20000
SiR < 2 * Sr	0,10 < 0,2

Utilizando os resultados obtidos na tabela 10 e seguindo a fórmula de cálculo do SIR, podemos concluir pela tabela 11 que, nas leveduras obtivemos um valor de desvio padrão de reprodutibilidade intralaboratorial de 0,104, pelo o que estamos dentro do limite aceitável e conseguimos um valor igual ao desvio padrão do estudo de validação( Anexo D). Assim podemos considerar satisfatório a verificação da implementação do método Symphony para a contagem de leveduras.

Tabela 12- Ensaios realizados para o cálculo do SIR para os **bolores**

Amostra (N)	Nível de contaminação esperado cfu/g	Resultado A ( $x_{iA}$ )	Resultado B ( $x_{iB}$ )
10629	$10^5$	150	200
10717	$10^5$	23500	27000
11913	$10^3$	250	300
12456	$10^5$	20000	31000
13022	$10^5$	450	200
13651	$10^5$	150	200
14090	$10^5$	200	700
14232	$10^3$	800	800
14316	$10^5$	12500	13000
14451	$10^5$	2400	2100

Log <sub>10</sub> Resultado A	Log <sub>10</sub> Resultado B	Diferença absoluta	Diferença de quadrados
		$ y_{iA} - Y_{iB} $	$ y_{iA} - Y_{iB} ^2$
$Y_{iA} = \log_{10}(X_{iA})$	$Y_{iB} = \log_{10}(X_{iB})$		
2,18	2,30	0,1249	0,0156
4,37	4,43	0,0603	0,0036
2,40	2,48	0,0792	0,0063
4,30	4,49	0,1903	0,0362
2,65	2,30	0,3522	0,1240
2,18	2,30	0,1249	0,0156
2,30	2,85	0,5441	0,2960
2,90	2,90	0,0000	0,0000
4,10	4,11	0,0170	0,0003
3,38	3,32	0,0580	0,0034

Legenda:  $x_A$  - n<sup>o</sup> de colónias obtidas pelo primeiro operador (ufc/g)  
 $x_B$  - n<sup>o</sup> de colónias obtidas pelo segundo operador (ensaio em paralelo) (ufc/g)

Apenas foram utilizadas para o cálculo 10 amostras, foram rejeitados todos os resultados com um numero de colónias de bolores inferiores a 100. No caso dos bolores, houve alguma dificuldade no crescimento das colónias, notámos que os bolores não recuperam tão eficazmente no meio Symphony quando há um elevado crescimento de leveduras, pelo o que tivemos que incluir duas amostras adicionais, que não estão incluídas no estudo do SIR para os bolores e leveduras e para as leveduras, que apenas contaminámos com *Aspergillus brasiliensis*. (Anexo G)

Tabela 13- Cálculo do SIR para os **bolores**

Soma $ y_iA - Y_iB ^2$	0,5010
N	10
Soma/(2*N)	0,0251
SiR= $\sqrt{0,0141}$	<b>0,158279272</b>
SR estudo validade	0,1
2 * Sr	0,20000
SiR < 2 * Sr	0,16 < 0,2

Com os resultados obtidos na tabela 12 e seguindo a fórmula do cálculo do SIR, podemos ver na tabela 13 que, para os bolores, obtivemos um valor de desvio padrão de reprodutibilidade intralaboratorial de 0,158, pelo o que estamos dentro do limite aceitável (Anexo D).

Assim podemos considerar satisfatório a verificação da implementação do método Symphony para a contagem de bolores.

#### 4.2 Verificação do produto alimentar (eBias)

Para o cálculo do eBias fez-se a diferença absoluta entre a média dos duplicados da amostra do produto alimentar contaminado artificialmente e o valor da suspensão do inóculo sem produto alimentar, isto é, somente as estirpes de referência foram inoculadas nas placas de Symphony, para cada nível de contaminação. A suspensão de inóculo foi preparada diluindo a sua concentração de  $10^7$  para  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^5$ , através do uso de dillicups com 9mL de diluente, no entanto, as amostras foram pesadas perfazendo 100mL (10g+ 90mL), o que se traduz em mais uma diluição pelo o que os valores finais foram ajustados, multiplicando os resultados da suspensão de inóculo por 10 (equivalente a uma diluição decimal). Através destes valores, podemos observar também que alimentos inibiram ou exponenciaram o crescimento de bolores e leveduras mais significativamente. Todos os resultados são convertidos em logaritmo de 10, os resultados do alimento artificialmente contaminado são expressos em log ufc/10g e os resultados da suspensão do inóculo em log ufc/mL, a diferença absoluta máxima permitida entre os dois logaritmos é inferior ou igual a 0,50 para que os ensaios de verificação do produto alimentar sejam conformes.

Foram analisadas um total de 10 amostras, 2 por cada uma das 5 categorias, todas elas entraram para o cálculo do eBias para os bolores e leveduras e para as leveduras, apenas foram rejeitadas, em alguns produtos alimentares, o nível de contaminação  $10^2$ , pois apresentavam um valor inferior a 100 ufc/g (10 colónias na placa). Para os bolores, entraram para o cálculo do eBias 7 amostras, pois não houve um crescimento tão significativo dos mesmos, assim sendo todos os resultados inferiores a 100 ufc/g foram retirados.

Tabela 14- Cálculo do eBias para os **bolores e leveduras** (Vermelho: estímulo do crescimento de bolores e leveduras; Azul: inibição do crescimento de bolores e leveduras) (Anexo H)

nível	Amostra		item contaminado artificialmente cfu/g	média item contaminado artificialmente cfu/g		item contaminado artificialmente log cfu/g
10 <sup>2</sup>	8975	cfu/g d1	2900	2500	log cfu/g d1	3,46
		cfu/g d1 R	2100		log cfu/g d1 R	3,32
10 <sup>3</sup>	8975	cfu/g d2	50000	42500	log cfu/g d2	4,70
		cfu/g d2 R	35000		log cfu/g d2 R	4,54
10 <sup>5</sup>	8975	cfu/g d3	85000	107500	log cfu/g d3	4,93
		cfu/g d3 R	130000		log cfu/g d3 R	5,11
10 <sup>3</sup>	9011	cfu/g d1	7000	7000	log cfu/g d1	3,85
		cfu/g d1 R	7000		log cfu/g d1 R	3,85
10 <sup>5</sup>	9011	cfu/g d2	68000	72500	log cfu/g d2	4,83
		cfu/g d2 R	77000		log cfu/g d2 R	4,89
10 <sup>3</sup>	10303	cfu/g d2	3900	3850	log cfu/g d2	3,59
		cfu/g d2 R	3800		log cfu/g d2 R	3,58
10 <sup>5</sup>	10303	cfu/g d3	36000	33500	log cfu/g d3	4,56
		cfu/g d3 R	31000		log cfu/g d3 R	4,49
10 <sup>2</sup>	10343	cfu/g d1	2600	3000	log cfu/g d1	3,41
		cfu/g d1 R	3400		log cfu/g d1 R	3,53
10 <sup>3</sup>	10343	cfu/g d2	15000	18500	log cfu/g d2	4,18
		cfu/g d2 R	22000		log cfu/g d2 R	4,34
10 <sup>5</sup>	10343	cfu/g d3	190000	255000	log cfu/g d3	5,28
		cfu/g d3 R	320000		log cfu/g d3 R	5,51
10 <sup>2</sup>	10542	cfu/g d1	300	400	log cfu/g d1	2,48
		cfu/g d1 R	500		log cfu/g d1 R	2,70
10 <sup>3</sup>	10542	cfu/g d2	3100	3150	log cfu/g d2	3,49
		cfu/g d2 R	3200		log cfu/g d2 R	3,51
10 <sup>5</sup>	10542	cfu/g d3	130000	125000	log cfu/g d3	5,11
		cfu/g d3 R	120000		log cfu/g d3 R	5,08
10 <sup>2</sup>	10832	cfu/g d1	600	500	log cfu/g d1	2,78
		cfu/g d1 R	400		log cfu/g d1 R	2,60
10 <sup>3</sup>	10832	cfu/g d2	5000	6000	log cfu/g d2	3,70
		cfu/g d2 R	7000		log cfu/g d2 R	3,85
10 <sup>5</sup>	10832	cfu/g d3	93000	73000	log cfu/g d3	4,97
		cfu/g d3 R	53000		log cfu/g d3 R	4,72
10 <sup>3</sup>	11930	cfu/g d1	3300	3150	log cfu/g d1	3,52
		cfu/g d1 R	3000		log cfu/g d1 R	3,48
10 <sup>5</sup>	11930	cfu/g d2	65000	67500	log cfu/g d2	4,81
		cfu/g d2 R	70000		log cfu/g d2 R	4,85
10 <sup>2</sup>	9070	cfu/g d1	700	650	log cfu/g d1	2,85
		cfu/g d1 R	600		log cfu/g d1 R	2,78
10 <sup>3</sup>	9070	cfu/g d2	6100	5800	log cfu/g d2	3,79
		cfu/g d2 R	5500		log cfu/g d2 R	3,74
10 <sup>5</sup>	9070	cfu/g d3	140000	135000	log cfu/g d3	5,15
		cfu/g d3 R	130000		log cfu/g d3 R	5,11
10 <sup>2</sup>	12004	cfu/g d1	1000	1250	log cfu/g d1	3,00
		cfu/g d1 R	1500		log cfu/g d1 R	3,18
10 <sup>3</sup>	12004	cfu/g d2	6300	6200	log cfu/g d2	3,80
		cfu/g d2 R	6100		log cfu/g d2 R	3,79
10 <sup>5</sup>	12004	cfu/g d3	89000	78500	log cfu/g d3	4,95
		cfu/g d3 R	68000		log cfu/g d3 R	4,83
10 <sup>3</sup>	12064	cfu/g d1	9500	9150	log cfu/g d1	3,98
		cfu/g d1 R	8800		log cfu/g d1 R	3,94
10 <sup>5</sup>	12064	cfu/g d2	91000	90500	log cfu/g d2	4,96
		cfu/g d2 R	90000		log cfu/g d2 R	4,95

		média item contaminado artificialmente log10 cfu/g	média item contaminado artificialmente log10 cfu/10g	suspensão do inóculo (s/ item)	log suspensão do inóculo (s/ item)	eBias	≤0,5 log <sub>10</sub> cfu/ml
10 <sup>2</sup>	8975	3,392308646	4,397940009	14000	4,146128036	0,251812	Cumpre
10 <sup>3</sup>	8975	4,621519024	5,621519024	150000	5,1761	0,445428	Cumpre
10 <sup>5</sup>	8975	5,021681139	6,021681139	1900000	6,2788	0,257072	Cumpre
10 <sup>3</sup>	9011	3,84509804	4,84509804	150000	5,1761	0,330993	Cumpre
10 <sup>5</sup>	9011	4,859499819	5,859499819	1900000	6,2788	0,419254	Cumpre
10 <sup>3</sup>	10303	3,585424102	4,585424102	110000	5,0414	0,455969	Cumpre
10 <sup>5</sup>	10303	4,523832097	5,523832097	1000000	6,0000	0,476168	Cumpre
10 <sup>2</sup>	10343	3,473226133	4,477121255	13000	4,113943352	0,363178	Cumpre
10 <sup>3</sup>	10343	4,25925697	5,25925697	120000	5,0792	0,180076	Cumpre
10 <sup>5</sup>	10343	5,39195179	6,39195179	1600000	6,2041	0,187832	Cumpre
10 <sup>2</sup>	10542	2,58804563	3,58804563	12000	4,0792	0,491136	Cumpre
10 <sup>3</sup>	10542	3,498255836	4,498255836	100000	5,0000	0,501744	Cumpre
10 <sup>5</sup>	10542	5,096562299	6,096562299	1700000	6,2304	0,133887	Cumpre
10 <sup>2</sup>	10832	2,690105621	3,690105621	11000	4,0414	0,351287	Cumpre
10 <sup>3</sup>	10832	3,772034022	4,77815125	100000	5	0,221849	Cumpre
10 <sup>5</sup>	10832	4,846379409	5,846379409	1400000	6,1461	0,299749	Cumpre
10 <sup>3</sup>	11930	3,497817597	4,497817597	90000	4,9542	0,456425	Cumpre
10 <sup>5</sup>	11930	4,829005698	5,829303773	1500000	6,176091259	0,346787	Cumpre
10 <sup>2</sup>	9070	2,811624645	3,811624645	13000	4,1139	0,302319	Cumpre
10 <sup>3</sup>	9070	3,762846262	4,762846262	140000	5,1461	0,383282	Cumpre
10 <sup>5</sup>	9070	5,130035694	6,130333768	1800000	6,255272505	0,124939	Cumpre
10 <sup>2</sup>	12004	3,08804563	4,08804563	13000	4,1139	0,025898	Cumpre
10 <sup>3</sup>	12004	3,792335192	4,792335192	140000	5,1461	0,353793	Cumpre
10 <sup>5</sup>	12004	4,89094946	5,894869657	1800000	6,255272505	0,360403	Cumpre
10 <sup>3</sup>	12064	3,961103139	4,961103139	140000	5,1461	0,185025	Cumpre
10 <sup>5</sup>	12064	4,956641951	5,956641951	1800000	6,2553	0,298631	Cumpre

De acordo com os resultados da tabela 14, temos 6 valores próximos de 0,50, ou seja, onde se obteve valores mais díspares, isto indica que houve interferência do alimento no crescimento dos microrganismos. Para a amostra 8975, cebola em tiras, podemos observar que o valor do logaritmo do produto alimentar é superior ao valor do logaritmo da suspensão do inóculo, isto quer dizer, que o alimento exponenciou o crescimento de bolores e leveduras, o que se pode dever à atividade de água ( $> 0,95$ ) e ao pH que são ideais para o desenvolvimento dos mesmos.

As amostras 10303, 10542 e 11930, que correspondem ao lombo de porco, ao sumo de romã e sabugueiro e às favas, respetivamente. Os resultados nestes produtos alimentares são inferiores aos resultados do controlo positivo, o que indica que a própria matriz alimentar inibiu o crescimento de bolores e leveduras. O lombo de porco tinha molho e um elevado teor de gordura e nutrientes, fatores que dificultam o crescimento. O sumo de romã e sabugueiro apresenta uma cor vermelha intensa e tem um forte poder antioxidante, o que pode interferir no desenvolvimento. As favas apesar de cruas, são congeladas pelo que a causa desta inibição se deve à sua composição e ao elevado teor de proteínas.

No geral, obteve-se valores dentro do limite aceitável pelo que podemos considerar verificado o produto alimentar para o parâmetro bolores e leveduras.

Tabela 15- Cálculo do eBias para as **leveduras** (Vermelho: estímulo do crescimento de bolores e leveduras; Azul: inibição do crescimento de bolores e leveduras) (Anexo I)

nível	Amostra		item contaminado artificialmente cfu/g	média item contaminado artificialmente cfu/g		item contaminado artificialmente log cfu/g
10 <sup>2</sup>	8975	cfu/g d1	2900	2500	log cfu/g d1	3,46
		cfu/g d1 R	2100		log cfu/g d1 R	3,32
10 <sup>3</sup>	8975	cfu/g d2	35000	42500	log cfu/g d2	4,54
		cfu/g d2 R	50000		log cfu/g d2 R	4,70
10 <sup>5</sup>	8975	cfu/g d3	85000	107500	log cfu/g d3	4,93
		cfu/g d3 R	130000		log cfu/g d3 R	5,11
10 <sup>3</sup>	9011	cfu/g d2	7000	7000	log cfu/g d2	3,85
		cfu/g d2 R	7000		log cfu/g d2 R	3,85
10 <sup>5</sup>	9011	cfu/g d3	68000	72500	log cfu/g d3	4,83
		cfu/g d3 R	77000		log cfu/g d3 R	4,89
10 <sup>3</sup>	10303	cfu/g d2	3800	3850	log cfu/g d2	3,58
		cfu/g d2 R	3900		log cfu/g d2 R	3,59
10 <sup>5</sup>	10303	cfu/g d3	36000	33500	log cfu/g d3	4,56
		cfu/g d3 R	31000		log cfu/g d3 R	4,49
10 <sup>2</sup>	10343	cfu/g d1	2600	2950	log cfu/g d1	3,41
		cfu/g d1 R	3300		log cfu/g d1 R	3,52
10 <sup>3</sup>	10343	cfu/g d2	15000	18500	log cfu/g d2	4,18
		cfu/g d2 R	22000		log cfu/g d2 R	4,34
10 <sup>5</sup>	10343	cfu/g d3	190000	255000	log cfu/g d3	5,28
		cfu/g d3 R	320000		log cfu/g d3 R	5,51
10 <sup>2</sup>	10542	cfu/g d1	300	400	log cfu/g d1	2,48
		cfu/g d1 R	500		log cfu/g d1 R	2,70
10 <sup>3</sup>	10542	cfu/g d2	2900	2950	log cfu/g d2	3,46
		cfu/g d2 R	3000		log cfu/g d2 R	3,48
10 <sup>5</sup>	10542	cfu/g d3	110000	110000	log cfu/g d3	5,04
		cfu/g d3 R	110000		log cfu/g d3 R	5,04
10 <sup>2</sup>	10832	cfu/g d1	300	400	log cfu/g d1	2,48
		cfu/g d1 R	500		log cfu/g d1 R	2,70
10 <sup>3</sup>	10832	cfu/g d2	5000	6000	log cfu/g d2	3,70
		cfu/g d2 R	7000		log cfu/g d2 R	3,85
10 <sup>5</sup>	10832	cfu/g d3	73000	57000	log cfu/g d3	4,86
		cfu/g d3 R	41000		log cfu/g d3 R	4,61
10 <sup>3</sup>	11930	cfu/g d2	2100	1850	log cfu/g d2	3,32
		cfu/g d2 R	1600		log cfu/g d2 R	3,20
10 <sup>5</sup>	11930	cfu/g d3	40000	42000	log cfu/g d3	4,60
		cfu/g d3 R	44000		log cfu/g d3 R	4,64
10 <sup>2</sup>	9070	cfu/g d1	700	650	log cfu/g d1	2,85
		cfu/g d1 R	600		log cfu/g d1 R	2,78
10 <sup>3</sup>	9070	cfu/g d2	4900	4700	log cfu/g d2	3,69
		cfu/g d2 R	4500		log cfu/g d2 R	3,65
10 <sup>5</sup>	9070	cfu/g d3	120000	120000	log cfu/g d3	5,08
		cfu/g d3 R	120000		log cfu/g d3 R	5,08
10 <sup>2</sup>	12004	cfu/g d1	800	1050	log cfu/g d1	2,90
		cfu/g d1 R	1300		log cfu/g d1 R	3,11
10 <sup>3</sup>	12004	cfu/g d2	4000	4000	log cfu/g d2	3,60
		cfu/g d2 R	4000		log cfu/g d2 R	3,60
10 <sup>5</sup>	12004	cfu/g d3	83000	72000	log cfu/g d3	4,92
		cfu/g d3 R	61000		log cfu/g d3 R	4,79
10 <sup>3</sup>	12064	cfu/g d2	6400	6550	log cfu/g d2	3,81
		cfu/g d2 R	6700		log cfu/g d2 R	3,83
10 <sup>5</sup>	12064	cfu/g d3	80000	79500	log cfu/g d3	4,90
		cfu/g d3 R	79000		log cfu/g d3 R	4,90

		média item contaminado artificialmente log10 cfu/g	média item contaminado artificialmente log10 cfu/10g	suspensão do inóculo (s/ item)	log suspensão do inóculo (s/ item)	ebias	≤0,5 log <sub>10</sub> cfu/ml
10 <sup>2</sup>	8975	3,39	4,40	10000	4	0,39794	Cumpre
10 <sup>3</sup>	8975	4,62	5,62	140000	5,1461	0,475391	Cumpre
10 <sup>5</sup>	8975	5,02	6,02	1200000	6,0792	0,0575	Cumpre
10 <sup>3</sup>	9011	3,85	4,85	140000	5,1461	0,30103	Cumpre
10 <sup>5</sup>	9011	4,86	5,86	1200000	6,0792	0,219681	Cumpre
10 <sup>3</sup>	10303	3,59	4,59	60000	4,7782	0,192727	Cumpre
10 <sup>5</sup>	10303	4,52	5,52	600000	5,7782	0,254319	Cumpre
10 <sup>2</sup>	10343	3,47	4,47	10000	4	0,469822	Cumpre
10 <sup>3</sup>	10343	4,26	5,26	110000	5,0414	0,217864	Cumpre
10 <sup>5</sup>	10343	5,39	6,39	1500000	6,1761	0,215861	Cumpre
10 <sup>2</sup>	10542	2,59	3,60	9000	3,954242509	0,352183	Cumpre
10 <sup>3</sup>	10542	3,47	4,47	90000	4,9542	0,484483	Cumpre
10 <sup>5</sup>	10542	5,04	6,04	1200000	6,0792	0,037789	Cumpre
10 <sup>2</sup>	10832	2,59	3,60	9000	3,954242509	0,352183	Cumpre
10 <sup>3</sup>	10832	3,77	4,77	90000	4,9542	0,182208	Cumpre
10 <sup>5</sup>	10832	4,74	5,74	1000000	6,0000	0,261947	Cumpre
10 <sup>3</sup>	11930	3,26	4,26	50000	4,6990	0,4358	Cumpre
10 <sup>5</sup>	11930	4,62	5,62	900000	5,9542	0,331486	Cumpre
10 <sup>2</sup>	9070	2,81	3,81	10000	4	0,187087	Cumpre
10 <sup>3</sup>	9070	3,67	4,67	120000	5,0792	0,407477	Cumpre
10 <sup>5</sup>	9070	5,08	6,08	1600000	6,2041	0,124939	Cumpre
10 <sup>2</sup>	12004	3,01	4,02	10000	4	0,021189	Cumpre
10 <sup>3</sup>	12004	3,60	4,60	120000	5,0792	0,477121	Cumpre
10 <sup>5</sup>	12004	4,85	5,85	1600000	6,2041	0,351916	Cumpre
10 <sup>3</sup>	12064	3,82	4,82	120000	5,0792	0,263054	Cumpre
10 <sup>5</sup>	12064	4,90	5,90	1600000	6,2041	0,303761	Cumpre

Relativamente ao crescimento de leveduras, podemos ver na tabela 15 que temos 3 valores com uma diferença significativa e estes correspondem ao número 8975, 10542 e 12004. As amostras número 8975 e 10542, a cebola em tiras e o sumo de romã e sabugueiro, obtiveram resultados semelhantes aos resultados correspondentes do eBias para os bolores e leveduras. A cebola estimulou o crescimento de leveduras enquanto o sumo de romã interferiu com o seu crescimento. A amostra 12004, trata-se de uma espetada de porco e podemos observar uma inibição do crescimento, pois o valor do controlo positivo é superior, que tanto se pode dever ao elevado teor de gorduras e nutrientes, como à adição de aditivos alimentares e temperos na sua composição.

No geral, todos os alimentos se inseriram dentro do valor aceitável de eBias, pelo que podemos considerar o método Symphony agar verificado para as leveduras.

Tabela 16- Cálculo do eBias para os **bolores** (Vermelho: estímulo do crescimento de bolores e leveduras; Azul: inibição do crescimento de bolores e leveduras) (Anexo J)

nível	Amostra		item contaminado artificialmente cfu/g	média item contaminado artificialmente cfu/g		item contaminado artificialmente log cfu/g
10 <sup>3</sup>	10343	cfu/g d1	200	250	log cfu/g d1	2,30
		cfu/g d1 R	300		log cfu/g d1 R	2,48
10 <sup>5</sup>	10343	cfu/g d1	3400	3000	log cfu/g d1	3,53
		cfu/g d1 R	2600		log cfu/g d1 R	3,41
10 <sup>3</sup>	10542	cfu/g d1	200	200	log cfu/g d1	2,30
		cfu/g d1 R	200		log cfu/g d1 R	2,30
10 <sup>5</sup>	10542	cfu/g d2	18000	16500	log cfu/g d2	4,26
		cfu/g d2 R	15000		log cfu/g d2 R	4,18
10 <sup>2</sup>	10832	cfu/g d1	100	100	log cfu/g d1	2,00
		cfu/g d1 R	100		log cfu/g d1 R	2,00
10 <sup>3</sup>	10832	cfu/g d2	200	300	log cfu/g d2	2,30
		cfu/g d2 R	400		log cfu/g d2 R	2,60
10 <sup>5</sup>	10832	cfu/g d3	20000	16000	log cfu/g d3	4,30
		cfu/g d3 R	12000		log cfu/g d3 R	4,08
10 <sup>3</sup>	11930	cfu/g d1	1200	1300	log cfu/g d1	3,08
		cfu/g d1 R	1400		log cfu/g d1 R	3,15
10 <sup>5</sup>	11930	cfu/g d2	25000	25500	log cfu/g d2	4,40
		cfu/g d2 R	26000		log cfu/g d2 R	4,41
10 <sup>3</sup>	9070	cfu/g d1	1200	1050	log cfu/g d1	3,08
		cfu/g d1 R	900		log cfu/g d1 R	2,95
10 <sup>3</sup>	9070	cfu/g d2	20000	16500	log cfu/g d2	4,30
		cfu/g d2 R	13000		log cfu/g d2 R	4,11
10 <sup>2</sup>	12004	cfu/g d1	300	250	log cfu/g d1	2,48
		cfu/g d1 R	200		log cfu/g d1 R	2,30
10 <sup>3</sup>	12004	cfu/g d2	2300	2650	log cfu/g d2	3,36
		cfu/g d2 R	3000		log cfu/g d2 R	3,48
10 <sup>5</sup>	12004	cfu/g d3	6000	6500	log cfu/g d3	3,78
		cfu/g d3 R	7000		log cfu/g d3 R	3,85
10 <sup>3</sup>	12064	cfu/g d1	3100	2600	log cfu/g d1	3,49
		cfu/g d1 R	2100		log cfu/g d1 R	3,32
10 <sup>5</sup>	12064	cfu/g d2	12000	12000	log cfu/g d2	4,08
		cfu/g d2 R	12000		log cfu/g d2 R	4,08

		média item contaminado artificialmente log10 cfu/g	média item contaminado artificialmente log10 cfu/10g	suspensão do inoculo (s/ item)	log suspensão do inoculo (s/ item)	ebias	≤0,5 log <sub>10</sub> cfu/ml
10 <sup>3</sup>	10343	2,39	3,39	7000	3,8451	0,456022	Cumpre
10 <sup>5</sup>	10343	3,47	4,47	90000	4,9542	0,481016	Cumpre
10 <sup>3</sup>	10542	2,30	3,30	6000	3,7782	0,477121	Cumpre
10 <sup>5</sup>	10542	4,22	5,22	500000	5,6990	0,483288	Cumpre
10 <sup>2</sup>	10832	2,00	3,00	2000	3,301029996	0,30103	Cumpre
10 <sup>3</sup>	10832	2,45	3,45	9000	3,9542	0,502698	Cumpre
10 <sup>5</sup>	10832	4,19	5,19	400000	5,6021	0,411954	Cumpre
10 <sup>3</sup>	11930	3,11	4,11	40000	4,6021	0,489405	Cumpre
10 <sup>5</sup>	11930	4,41	5,41	600000	5,7782	0,371695	Cumpre
10 <sup>3</sup>	9070	3,02	4,02	20000	4,301029996	0,279841	Cumpre
10 <sup>3</sup>	9070	4,21	5,21	200000	5,3010	0,093543	Cumpre
10 <sup>2</sup>	12004	2,39	3,40	3000	3,477121255	0,079181	Cumpre
10 <sup>3</sup>	12004	3,42	4,42	20000	4,3010	0,118395	Cumpre
10 <sup>5</sup>	12004	3,81	4,81	200000	5,3010	0,489405	Cumpre
10 <sup>3</sup>	12064	3,41	4,41	20000	4,301029996	0,113943	Cumpre
10 <sup>5</sup>	12064	4,08	5,08	200000	5,3010	0,221849	Cumpre

No caso dos bolores, obtivemos mais resultados perto do limite aceitável, isto significa que os bolores são mais influenciados pelo tipo de matriz alimentar.

Observando a tabela 16, voltamos a ter a amostra 8973, a cebola em tiras como um alimento que incentivou o crescimento de microrganismos e o 10542 (sumo de romã e sabugueiro), o 11930 (favas) e o 12004 (espetada de porco) como alimentos que inibiram o crescimento de bolores, o que se deve às suas características já mencionadas anteriormente. Uma nova amostra em que subiu o valor de eBias, identificada com o número 10832, é o queijo, que tem na sua composição bactérias lácticas responsáveis pela fermentação e tem um pH ácido, dado estes fatores há uma dificuldade para o desenvolvimento de microrganismos e sendo os bolores microrganismos de propagação mais lenta que as leveduras, o seu crescimento foi mais consideravelmente inibido.

No geral, todos os valores se encontram dentro do limite aceitável para a verificação do produto alimentar, pelo que podemos considerar satisfatório o método Symphony agar para a contagem de bolores.

## V- Conclusão

Após seguir todo o protocolo da ISO 1640-3 e considerando, ao longo de todo o relatório, o estudo de validação realizado pela AFNOR, podemos considerar o método alternativo Symphony agar implementado no laboratório Globalab, obtendo resultados de verificação do método em laboratório satisfatórios. Para a verificação da implementação tínhamos como objetivo demonstrar que o laboratório realiza o método corretamente, por meio do cálculo do desvio de reprodutibilidade intralaboratorial. Assim, por meio da realização de ensaios em paralelo, fomos obter o grau de concordância entre os resultados, tendo em conta o erro associado a diferentes variáveis (operador, equipamento, material, amostra etc.), isto é, conseguimos calcular a incerteza técnica do método em laboratório. Para os bolores e leveduras e para as leveduras alcançou-se um valor de 0,106 e 0,104, respetivamente, valores estes muito idênticos ao valor do desvio padrão na validação (0,100).

Para os bolores obteve-se um valor de 0,158, um pouco mais alto, mas dentro do limite aceitável, isto deve-se ao facto dos bolores se propagarem mais lentamente, obtendo um menor número de colónias por amostra, comparativamente às leveduras. Desta forma, podemos demonstrar que seguimos o protocolo corretamente e concluir que conseguimos executar o método Symphony agar no laboratório Globalab.

Na verificação do produto alimentar, o objetivo era demonstrar que os técnicos de laboratório eram capazes de testar os produtos alimentares, incluídos no objetivo de aplicação em laboratório e no âmbito da validação. Assim selecionou-se 5 categorias e analisou-se 2 alimentos desafiantes por categoria, por meio de ensaios em duplicado, acompanhados com um controlo negativo e um controlo positivo. Desta forma, conseguimos obter a precisão estimada do método, que está relacionada aos erros acidentais que podem ocorrer com o mesmo operador a realizar o mesmo ensaio (por exemplo: movimento inadequado do operador ou do aparelho). Todos os valores para o eBias foram inferiores a 0,50 tanto nos bolores e leveduras, como nas leveduras e como nos bolores, pelo que podemos concluir que conseguimos testar os produtos frequentemente analisados, de acordo com o método Symphony, em laboratório.

Podemos, assim, afirmar que o laboratório Globalab cumpre as características do método alternativo Symphony agar e este é adequado para utilizar nas amostras realizadas na sua rotina laboratorial

Os bolores e leveduras dispersam-se rapidamente nos alimentos e no ar devido aos seus esporos, pelo que, ao detetarmos estes microrganismos o mais cedo possível nos alimentos podemos evitar uma contaminação de larga escala que seja transferida, quer para superfícies, utensílios ou lotes inteiros do produto alimentar. Além disso, são indicativos do nível de deterioração dos alimentos deixando uma aspeto, cheiro e sabor desagradável ao alimento, retirando a qualidade do mesmo.

O método alternativo ao detetar mais rapidamente a contaminação por bolores e leveduras pode evitar que estes problemas aconteçam, mas nada como uma boa higiene dos alimentos, utensílios e superfícies e a manutenção de um bom controlo de qualidade em todas as áreas do setor alimentar para garantir a qualidade dos produtos e salvaguardar a saúde pública.

Considero este método alternativo um pequeno passo na melhoria da segurança alimentar e no controlo microbiológico dos produtos alimentares, trata-se de um método simples e eficaz que descomplica, relativamente ao método de referência, ao ter um protocolo independente da atividade água e ao diminuir o tempo de incubação para 54 a 72h em vez dos 5 dias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]- Matias, J. C. D., Fonseca, J. M. J., Barata, I. G., & Brojo, F- HACCP and OHS: Can each one help improve the other in the catering sector? [Article]. *Food Control*, 30(2012), 240-250.
- [2]- Ferreira, Wanda F. Canas, et al.- *Microbiologia*. Lidel, 2nd ed.,9 (1998), Lisboa, Lidel, 166–168.
- [3]- McGinnis, Michael R., and Stephen K. Tyring- Introduction to Mycology. In: Albrecht, Thomas et. al. *Medical Microbiology*, 4th ed. Galveston (TX): Baron, S. 1996. ISBN: 0-9631172-1-1.
- [4]- Quality Assurance, Nestlé. “News – Nestlé Quality Assurance Center (NQAC) – Dublin.” *Nestlé Quality Assurance*. Acedido a 22 de Abril 2022. Disponível em: [www.nqacdublin.com/News/](http://www.nqacdublin.com/News/)
- [5]- Osman, Erkmen, and Bozoğlu, T. Faruk. *Food Microbiology : Principles into Practice*. 1ªed. Chichester, West Sussex : Hoboken, Nj, John Wiley & Sons, Inc. 2016. ISBN: 9781119237860
- [6]- Tournas, V., et. al. - *Bacteriological Analytical Manual*. 8th Edition. EUA: Technical Editing Branch, Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA, 1998.
- [7]- Liew, Winnie-Pui-Pui, and Sabran Mohd-Redzwan. *Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota*. *Front Cell Infect Microbiology*. 1(2018).
- [8]- Montero-Julian, F.- *Aspergillus brasiliensis: How it contaminates the humans*. França, 2021. Acedido a 23 de Abril de 2022. Disponível em: <https://www.biomerieux-industry.com/en-us/pharma-healthcare/resources/pharma-microorganisms-library/2021-11-24-aspergillus-brasiliensis-how>
- [9]- Krijgheld, P., et al. -“Development in Aspergillus.” *Studies in Mycology*, vol 74 (2013), p. 1–29.
- [10]- Jouhten, Paula, et al. - “Saccharomyces Cerevisiae metabolism in Ecological Context.” *FEMS Yeast Research*, vol 16(2016).
- [11]- Narendranath, Neelakantam V., and Ronan Power- Relationship between PH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of Lactobacilli and

Saccharomyces Cerevisiae during Ethanol Production.” *Applied and Environmental Microbiology*, vol 71(2005), p 2239 – 2243.

[12]- Rane, Hallie S., et al.- *Candida Albicans Pma1p Contributes to Growth, PH Homeostasis, and Hyphal Formation*. 1( 2019).

[13]- ISO- “About Us.” ISO, Suíça. Acedido a 17 de Maio 2022. Disponível em: [www.iso.org/about-us.html](http://www.iso.org/about-us.html).

[14]- Portal ePortugal- “Instituto Português da Acreditação” .Portugal , 2022. Acedido a 17 de Maio 2022- Disponível em: <https://eportugal.gov.pt/entidades/instituto-portugues-de-acreditacao>

[15]- IPAC: Instituto Português de Acreditação. Portugal. Acedido a 17 de Maio de 2022. Disponível em: <http://www.ipac.pt/ipac/contactos.asp>

[16]- AFNOR Group- “Who We Are.” França. Acedido a 24 de Maio de 2022. Disponível em: [www.afnor.org/en/about-us/who-we-are/](http://www.afnor.org/en/about-us/who-we-are/)

[17]- ISO: Internation Organization for Standardization “Membership: Member Body”. ISO. Acedido a 24 de Maio de 2022.Disponível em: <https://www.iso.org/member/1738.html>

[18]- Cerification, AFNOR. “NF VALIDATION.” NF Validation. Acedido a 24 de Maio 2022. Disponível em [nf-validation.afnor.org/en/nf-validation/](http://nf-validation.afnor.org/en/nf-validation/)

[19]- “ISO/IEC 17025 Testing and Calibration Laboratories.” ISO, 2017. Acedido a 25 de Maio de 2022. Disponível em: [www.iso.org/ISO-IEC-17025-testing-and-calibration-laboratories.html](http://www.iso.org/ISO-IEC-17025-testing-and-calibration-laboratories.html).

[20]- **ISO– International Organization of Standardization (2017)**. ISO 6887-1:2017- Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

[21]- Associação de Laboratórios Acreditados em Portugal, Relacre. CSR -ÁGUAS CSR - ALIMENTOS NOTA TÉCNICA. Portugal, RELACRE, 2018. Acedido a 26 de Maio de 2022. Disponível em [https://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commissionsandpublications/NOTA%20TECNICA%20RELACRE%20N%c2%ba%205\\_05\\_12\\_2018.pdf](https://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commissionsandpublications/NOTA%20TECNICA%20RELACRE%20N%c2%ba%205_05_12_2018.pdf)

[22]- **ISO – International Organization of Standardization (2021)**. ISO 16140-3 - Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory.

[23]- IPAC: Instituto Português de Acreditação- “ A Acreditação” .IPAC. Acedido a 17 de Maio de 2022. Disponível em : <http://www.ipac.pt/ipac/funcao.asp>

[24]- Servimetro: serviços de metrologia- “Porquê recorrer a um laboratório acreditado“. Aceido a 17 de Maio 2022. Disponível em: <https://www.servimetro.pt/curiosidades/porque-recorrer-a-um-laboratorio-acreditado>

[25]- SOLABIA Group. SYMPHONY AGAR ENUMERATION of YEASTS & MOLDS I INTENDED USE

[26]- **ISO – International Organization of Standardization (2008)**. ISO 21527-1 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95 e **ISO – International Organization of Standardization (2008)**. ISO 21527-2 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95

[27]- Adria Developpement, and SOLABIA. “NF VALIDATION Validation Des Méthodes Alternatives d’Analyse Application à La Microbiologie Alimentaire.” 8 Jan. 2019. Obtido a 20 Abril 2022

[28]- **ISO– International Organization of Standardization (2017)**. ISO/IEC 17025 - Testing and calibration laboratories.

[29]- **ISO – International Organization of Standardization (2014)**. ISO 11133: 2014 Amendment 1:2018 - Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

[30]- BIODIAGNOSTICS. *CALDO TRIPTONA-SAL- FICHA TÉCNICA*. 2018.

[31]- Globalab. PG-19 Seleção E Validação de Métodos. 17 Oct. 2016.

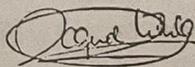
[32]- WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms. WFCC. Acedido a 20 de Maio de 2022. Disponível em: <https://www.wdcm.org/index.html>



# ANEXOS

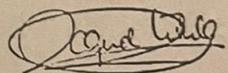
## Anexo A

### Ficha técnica do Material de Referência: *Aspergillus brasiliensis*

 <b>ANALYSIS REPORT</b> 	
<b>BAControl-5</b> (reference material, RM) 	
<b>Producer</b> ielab Calidad, S.L. C/ Dracma, 7 Pol. Ind. Las Atalayas 03114 Alicante (España) Tlf: +34 966 10 55 01	<b>Producer analysis conditions</b> <b>Laboratory:</b> one laboratory following ISO 17025 requirements <b>Dilutions:</b> Up to 10 <sup>1</sup> <b>Analyzed volume:</b> 3 mL
<b>Description</b> <b>Part No.:</b> 990161 <b>Microorganism:</b> <i>Aspergillus brasiliensis</i> V585 traceable to CECT 2574 (corresponds to ATCC 16404; WDCM 00053), with one passage from de Culture Collection reference stock strain	<b>Technique:</b> Filtration <b>Incubation temperature:</b> 36 ± 2° C <b>Incubation period:</b> 68 ± 4h <b>Culture medium:</b> Rose Bengal agar + Chloramphenicol <b>Filtration membranes:</b> Mixed cellulose esters (0.45 µm)
<b>Batch No.:</b> PAB40014 <b>Manufacturing date:</b> 04-Feb-2022	<b>Quality controls in the described analysis conditions</b> <b>Contamination:</b> Not detected <b>Homogeneity:</b> Homogeneous (u <sub>H</sub> =0.025 log) <b>Stability:</b> Stable (u <sub>E</sub> =0.068 log)
<b>Expiry date:</b> 11-Mar-2023 <b>Format:</b> Freeze-dried tablet	<b>Results obtained in the reconstitution volume</b> <b>Percentage of analyzed batch:</b> 15% <b>Number of test:</b> 56 <b>Obtained value:</b> 1.43x10 <sup>3</sup> cfu/tablet <b>95% Confidence interval:</b> 5x10 <sup>2</sup> - 4.09x10 <sup>3</sup> cfu
<b>Authenticity proof of the used Culture Collection strain</b> Microscopic observation	Alicante, 11 <sup>th</sup> of March 2022
<b>Safety information</b> Risk group 2	
<b>Storage conditions</b> Keep at -20±5°C	Raquel Murtula Corbi Technical manager of microbiology
<b>Intended use</b> Internal quality controls in terms of precision (control of process, control charts and culture media quality controls)	
<b>Reconstitution conditions</b> (indicated in the User Guide) <b>Solvent:</b> Sterile distilled water <b>Volume:</b> 20 mL <b>Reconstitution time:</b> 10 minutes	

## Anexo B

Ficha técnica do Material de Referência: *Saccharomyces cerevisiae*

 <b>ANALYSIS REPORT</b> 	
<b>BAControl-5</b> (reference material, RM)  <small>Derived from CECT® strains</small>	
<b>Producer</b> ielab Calidad, S.L. C/ Dracma, 7 Pol. Ind. Las Atalayas 03114 Alicante (España) Tlf: +34 966 10 55 01	<b>Producer analysis conditions</b> <b>Laboratory:</b> one laboratory following ISO 17025 requirements <b>Dilutions:</b> Up to 10 <sup>3</sup> <b>Analyzed volume:</b> 3 mL <b>Technique:</b> Filtration <b>Incubation temperature:</b> 36 ± 2° C <b>Incubation period:</b> 21 ± 3h <b>Culture medium:</b> YM agar (Yeast and Mould) <b>Filtration membranes:</b> Mixed cellulose esters (0.45 µm)
<b>Description</b> <b>Part No.:</b> 992534 <b>Microorganism:</b> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VI36 traceable to CECT 1383 (corresponds to ATCC 9763; WDCM 00058), with one passage from de Culture Collection reference stock strain <b>Batch No.:</b> PSC40007 <b>Manufacturing date:</b> 06-Apr-2022 <b>Expiry date:</b> 13-May-2023 <b>Format:</b> Freeze-dried tablet	<b>Quality controls in the described analysis conditions</b> <b>Contamination:</b> Not detected <b>Homogeneity:</b> Homogeneous (u <sub>H</sub> =0.040 log) <b>Stability:</b> Stable (u <sub>E</sub> =0.058 log)
<b>Authenticity proof of the used Culture Collection strain</b> Microscopic observation	<b>Results obtained in the reconstitution volume</b> <b>Percentage of analyzed batch:</b> 15% <b>Number of test:</b> 56 <b>Obtained value:</b> 1.54x10 <sup>5</sup> cfu/tablet <b>95% Confidence interval:</b> 7.59x10 <sup>4</sup> - 3.12x10 <sup>5</sup> cfu
<b>Safety information</b> Risk group 2	
<b>Storage conditions</b> Keep at -20±5°C	
<b>Intended use</b> Internal quality controls in terms of precision (control of process, control charts and culture media quality controls)	
<b>Reconstitution conditions</b> (indicated in the User Guide) <b>Solvent:</b> Sterile distilled water <b>Volume:</b> 20 mL <b>Reconstitution time:</b> 10 minutes	
	Alicante, 13 <sup>th</sup> of May 2022  Raquel Murtula Corbi Technical manager of microbiology
	comercial@ielab.es www.ielab.es Page: 1/1 Version: 0

## Anexo C

### Ficha técnica do Material de Referência: *Candida albicans*



# ANALYSIS REPORT



## BAControl-5

(reference material, RM)



Derived from CECT® strains

**Producer**  
ielab Calidad, S.L.  
C/ Dracma, 7  
Pol. Ind. Las Atalayas  
03114 Alicante (España)  
Tlf: +34 966 10 55 01

**Producer analysis conditions**  
**Laboratory:** one laboratory following ISO 17025 requirements  
**Dilutions:** Up to 10<sup>1</sup>  
**Analyzed volume:** 5 mL  
**Technique:** Filtration  
**Incubation temperature:** 36 ± 2° C  
**Incubation period:** 44 ± 4h  
**Culture medium:** TSA (Tryptone soya agar)  
**Filtration membranes:** Mixed cellulose esters (0.45 µm)

**Description**  
**Part No.:** 990159  
**Microorganism:** *Candida albicans* V588 traceable to CECT 1394 (corresponds to ATCC 10231; WDCM 00054), with one passage from de Culture Collection reference stock strain

**Quality controls in the described analysis conditions**  
**Contamination:** Not detected  
**Homogeneity:** Homogeneous (u<sub>H</sub>=0.022 log)  
**Stability:** Stable (u<sub>E</sub>=0.045 log)

**Batch No.:** PCA40010  
**Manufacturing date:** 30-Nov-2021  
**Expiry date:** 07-Jan-2023  
**Format:** Freeze-dried tablet

**Results obtained in the reconstitution volume**  
**Percentage of analyzed batch:** 15%  
**Number of test:** 56  
**Obtained value:** 2.09x10<sup>3</sup> cfu/tablet  
**95% Confidence interval:**  
1.07x10<sup>3</sup> - 4.07x10<sup>3</sup> cfu

**Authenticity proof of the used Culture Collection strain**  
Microscopic observation

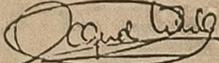
**Safety information**  
Risk group 2

**Storage conditions**  
Keep at -20±5°C

**Intended use**  
Internal quality controls in terms of precision (control of process, control charts and culture media quality controls)

**Reconstitution conditions**  
(indicated in the User Guide)  
**Solvent:** Sterile distilled water  
**Volume:** 20 mL  
**Reconstitution time:** 10 minutes

Alicante, 7<sup>th</sup> of January 2022



Raquel Múrtula Corbí  
Technical manager of microbiology

comercial@ielab.es  
www.ielab.es  
Page: 1  
Version:



**Anexo D**

Valores de precisão, de reprodutibilidade e incerteza para o método Symphony, obtidos no estudo de validação (obtido relatório de estudo de validação pela AFNOR, página 51 [https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2019/07/Synt-BKR-23-11-12-18\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2019/07/Synt-BKR-23-11-12-18_en.pdf))

**Tableau 16 - Interprétation avec 9 collaborateurs**

Accuracy profile			
Study Name	SYMPHONY Agar		
Date	October 2018		
Coordinator	ADRIA Développement		
Tolerance probability (beta)	80%	80%	80%
Acceptability limit in log (lambda)	0,50	0,50	0,50

Application of clause 6.2.3  
 Step 8: If any of the values for the (J-TI) fall outside the acceptability limits, calculate the pooled average reproducibility standard deviation of the reference method.  
 Step 9: Calculate new acceptability limits as a function of this standard deviation.

Levels	Alternative method			Reference method		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High
Target value	2,720	3,626	4,933			
Number of participants (K)	9	9	9	9	9	9
Average for alternative method	2,689	3,668	4,885	2,720	3,626	4,933
Repeatability standard deviation (sr)	0,097	0,080	0,090	0,096	0,055	0,094
Between-labs standard deviation (sL)	0,022	0,177	0,083	0,091	0,128	0,096
Reproducibility standard deviation (sR)	0,100	0,194	0,123	0,132	0,139	0,135
Corrected number of dof	16,808	9,461	13,408	13,241	9,366	12,833
Coverage factor	1,372	1,446	1,402			
Interpolated Student t	1,334	1,378	1,348			
Tolerance interval standard deviation	0,1024	0,2039	0,1277			
Lower TI limit	2,552	3,387	4,713			
Upper TI limit	2,826	3,949	5,057			
Bias	-0,031	0,042	-0,048			
Relative Lower TI limit (beta = 80%)	-0,167	-0,239	-0,220	FAUX		
Relative Upper TI limit (beta = 80%)	0,106	0,323	0,124	FAUX		
Lower Acceptability Limit	-0,50	-0,50	-0,50			
Upper Acceptability Limit	0,50	0,50	0,50			
<b>New acceptability limits may be based on reference method pooled variance</b>						
Pooled repro standard dev of reference	0,135					

## Anexo E

Amostras e respetivos resultados utilizados para o cálculo do SIR para os bolores e leveduras

Data	Nº Amostra	Origem/Produto	Fornecedor/Lote:	Gama	Material referência	Operador D1	Valor Obtido - D1	Valor Obtido - D1 - R	Operador D2	Valor Obtido - D2
01/jun	8974	Tomate	Campotec/220601	10 <sup>2</sup>	C.albicans+A.niger	Rita	1,00E+02	3,00E+02	Tatiana	<1,0E+02
01/jun	8974	Tomate	Campotec/220601	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger	Rita	9,90E+02	6,00E+02	Tatiana	1,20E+03
01/jun	8974	Tomate	Campotec/220601	10 <sup>5</sup>	C.albicans+A.niger	Rita	4,70E+04	8,80E+04	Tatiana	7,40E+04
02/jun	9036	Tomate	Campotec/220602	10 <sup>5</sup>	S.cerevisae+A.niger	Tatiana	1,20E+04	1,20E+04		
22/jun	10301	Tomate	Campotec/220622	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger	Joana	2,40E+03	3,60E+03	Tatiana	1,70E+03
23/jun	10352	Tomate	Campotec/220623	10 <sup>2</sup>	S.cerevisae+A.niger	Liliana	2,00E+02	2,00E+02	Tatiana	4,00E+02
29/jun	10629	Tomate	Campotec/220627	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger	Tatiana	2,90E+03	2,30E+03	Joana	2,40E+03
29/jun	10717	Tomate	Campotec/220628	10 <sup>5</sup>	C.albicans+A.niger	Joana	2,40E+05	2,60E+05	Tatiana	2,60E+05
01/jul	10902	Tomate	Campotec/220630	10 <sup>2</sup>	S.cerevisae+A.niger	Tatiana	1,20E+03	2,00E+02	Joana	4,00E+02
13/jul	11913	Tomate	Campotec/220713	10 <sup>3</sup>	S.cerevisae+A.niger	Joana	1,40E+03	7,00E+02	Rita	1,10E+03
14/jul	12040	Tomate	Campotec/220714	10 <sup>2</sup>	C.albicans+A.niger	Tatiana	7,00E+02	<1,0E+02	liliana	2,00E+02
27/jul	13022	Tomate	Campotec/220727	10 <sup>5</sup>	S.cerevisae+A.niger	Joana	1,80E+05	1,70E+05	liliana	1,80E+05
01/ago	13318	Tomate	Campotec/220801	10 <sup>5</sup>	C.albicans+A.niger	Liliana	9,70E+03	1,10E+04	Tatiana	1,20E+04
03/ago	13552	Tomate	Campotec/220803	10 <sup>5</sup>	S.cerevisae+A.niger	Tatiana	6,90E+04	6,10E+04	Rita	7,20E+04
04/ago	13651	Tomate	Campotec/220804	10 <sup>5</sup>	C.albicans+A.niger	Tatiana	1,50E+05	1,30E+05	liliana	1,30E+05
11/ago	14090	Tomate	Campotec/220811	10 <sup>5</sup>	S.cerevisae+A.niger	Liliana	9,80E+04	6,70E+04	Tatiana	1,20E+05

## Anexo F

Amostras e respetivos resultados utilizados para o cálculo do SIR para leveduras

Data	Nº Amostra	Origem/Produto	Fornecedor/Lote:	Gama	Material referência	Operador D1	Valor Obtido - D1	Valor Obtido - D1 - R	Operador D2	Valor Obtido - D2
01/jun	8974	Tomate	Campotec/220601	10 <sup>2</sup>	C.albicans	Rita	1,00E+02	3,00E+02	Tatiana	<1,0E+02
01/jun	8974	Tomate	Campotec/220601	10 <sup>3</sup>	C.albicans	Rita	9,90E+02	6,00E+02	Tatiana	1,20E+03
01/jun	8974	Tomate	Campotec/220601	10 <sup>5</sup>	C.albicans	Rita	4,70E+04	8,80E+04	Tatiana	7,40E+04
02/jun	9036	Tomate	Campotec/220602	10 <sup>5</sup>	S.cerevisae	Tatiana	1,20E+04	1,20E+04		
22/jun	10301	Tomate	Campotec/220622	10 <sup>3</sup>	C.albicans	Joana	2,00E+02	3,60E+02	Tatiana	1,70E+02
23/jun	10352	Tomate	Campotec/220623	10 <sup>2</sup>	S.cerevisae	Liliana	2,00E+02	2,00E+02	Tatiana	3,00E+02
29/jun	10629	Tomate	Campotec/220627	10 <sup>3</sup>	C.albicans	Tatiana	2,80E+04	2,10E+04	Joana	2,20E+04
29/jun	10717	Tomate	Campotec/220628	10 <sup>5</sup>	C.albicans	Joana	2,10E+05	2,40E+05	Tatiana	2,30E+05
01/jul	10902	Tomate	Campotec/220630	10 <sup>2</sup>	S.cerevisae	Tatiana	1,10E+02	2,00E+02	Joana	4,00E+02
13/jul	11913	Tomate	Campotec/220713	10 <sup>3</sup>	S.cerevisae	Joana	1,30E+03	3,00E+02	Rita	9,00E+02
14/jul	12040	Tomate	Campotec/220714	10 <sup>2</sup>	S.cerevisae	Tatiana	7,00E+02	<1,0E+02	liliana	2,00E+02
27/jul	13022	Tomate	Campotec/220727	10 <sup>5</sup>	S.cerevisae	Joana	1,80E+05	1,70E+05	liliana	1,80E+05
01/ago	13318	Tomate	Campotec/220801	10 <sup>5</sup>	C.albicans	Liliana	9,70E+03	1,10E+04	Tatiana	1,20E+04
03/ago	13552	Tomate	Campotec/220803	10 <sup>5</sup>	S.cerevisae	Tatiana	6,90E+04	6,10E+04	Rita	7,20E+04
04/ago	13651	Tomate	Campotec/220804	10 <sup>5</sup>	C.albicans	Tatiana	1,50E+05	1,30E+05	liliana	1,30E+05
11/ago	14090	Tomate	Campotec/220811	10 <sup>5</sup>	S.cerevisae	Liliana	9,80E+04	6,70E+04	Tatiana	1,20E+05

## Anexo G

Amostras e respetivos resultados utilizados para o cálculo do SIR para os bolores

Data	Nº Amostra	Origem/Produto	Fornecedor/Lote	Gama	Material referência	Operador D1	Valor Obtido - D1	Valor Obtido - D1 -	Operador D2	Valor Obtido - D2
22/jun	10301	Tomate	Campotec/220622	10 <sup>3</sup>	A.niger	Joana	<1,0E+02	<1,0E+02	Tatiana	1,00E+02
23/jun	10352	Tomate	Campotec/220623	10 <sup>2</sup>	A.niger	Liliana	<1,0E+02	<1,0E+02	Tatiana	1,00E+02
29/jun	10629	Tomate	Campotec/220627	10 <sup>3</sup>	A.niger	Tatiana	1,00E+02	2,00E+02	Joana	2,00E+02
29/jun	10717	Tomate	Campotec/220628	10 <sup>5</sup>	A.niger	Joana	2,80E+04	1,90E+04	Tatiana	2,70E+04
01/jul	10902	Tomate	Campotec/220630	10 <sup>2</sup>	A.niger	Tatiana	1,00E+02	<1,0E+02	Joana	<1,0E+02
13/jul	11913	Tomate	Campotec/220713	10 <sup>3</sup>	A.niger	Joana	1,00E+02	4,00E+02	Rita	3,00E+02
20/jul	12456	Tomate	Campotec/220720	10 <sup>5</sup>	A.niger	Joana	1,70E+04	2,30E+04	Liliana	3,10E+04
27/jul	13022	Tomate	Campotec/220727	10 <sup>5</sup>	A.niger	Joana	3,00E+02	6,00E+02	liliana	2,00E+02
03/ago	13552	Tomate	Campotec/220803	10 <sup>2</sup>	A.niger	Tatiana	<1,0E+02	<1,0E+02	Rita	<1,0E+02
04/ago	13651	Tomate	Campotec/220804	10 <sup>2</sup>	A.niger	Tatiana	2,00E+02	1,00E+02	Liliana	2,00E+02
11/ago	14090	Tomate	Campotec/220811	10 <sup>2</sup>	A.niger	Liliana	2,00E+02	2,00E+02	Tatiana	7,00E+02
16/ago	14232	Tomate	Campotec/220816	10 <sup>2</sup>	A.niger	Joana	9,00E+02	7,00E+02	Tatiana	8,00E+02
17/ago	14316	Tomate	Campotec/220817	10 <sup>5</sup>	A.niger	Liliana	1,20E+04	1,30E+04	Joana	1,30E+04
20/ago	14451	Tomate	Campotec/220820	10 <sup>3</sup>	A.niger	Tatiana	2,30E+03	2,50E+03	Joana	2,10E+03

## Anexo H

Amostras e resultados obtidos para o cálculo do eBias para os bolores e leveduras

Data	Nº Amostra	Categoria	Origem /Produto	Gama	Material referência	Controlo Negativo	Operador D1	Valor Obtido - D1	Operador D2	Valor Obtido - D2
01/jun	8975	Frutas e vegetais processados	Cebola Tiras	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger	0,00E+00	A	2,90E+03	2,10E+03 B	3,70E+03
01/jun	8975		Cebola Tiras	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger		A	5,00E+04	3,50E+04 B	3,30E+04
01/jun	8975		Cebola Tiras	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger		A	8,50E+04	1,30E+05 B	1,30E+05
01/jun	9011	Bebidas não alcoolicas	Sumo melão	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger	0,00E+00	B	<1,0E+02	<1,0E+02 A	5,00E+02
01/jun	9011		Sumo melão	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger		B	7,00E+03	7,00E+03 A	6,00E+03
01/jun	9011		Sumo melão	10 <sup>5</sup>	C.albicans+A.niger		B	6,80E+04	7,70E+04 A	4,30E+04
22/jun	10303	Refeição composta	Lombo de porco c/	10 <sup>5</sup>	C.albicans+A.niger	0,00E+00	A	2,00E+02	<1,0E+02 C	<1,0E+02
22/jun	10303		Lombo de porco c/	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger		A	3,80E+03	3,90E+03 C	3,40E+03
22/jun	10303		Lombo de porco c/	10 <sup>5</sup>	C.albicans+A.niger		A	3,60E+04	3,10E+04 C	3,30E+04
23/jun	10343	Carne crua	Salsicha fresca	10 <sup>3</sup>	S.cerevisiae+A.niger	1,60E+02	D	2,60E+03	3,40E+03 A	3,80E+03
23/jun	10343		Salsicha fresca	10 <sup>3</sup>	S.cerevisiae+A.niger		D	1,50E+04	2,20E+04 A	2,60E+04
23/jun	10343		Salsicha fresca	10 <sup>5</sup>	S.cerevisiae+A.niger		D	1,90E+05	3,20E+05 A	2,50E+05
01/jul	10542	Bebidas não alcoolicas	Sumo romã e sabuj	10 <sup>2</sup>	C.albicans+A.niger	0,00E+00	C	3,00E+02	5,00E+02 A	2,00E+02
01/jul	10542		Sumo romã e sabuj	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger		C	3,10E+03	3,20E+03 A	2,20E+03
01/jul	10542		Sumo romã e sabuj	10 <sup>5</sup>	C.albicans+A.niger		C	1,30E+05	1,20E+05 A	1,50E+05
01/jul	10832	Derivados leite	Queijo	10 <sup>2</sup>	S.cerevisiae+A.niger	0,00E+00	B	6,00E+02	4,00E+02 A	3,00E+02
01/jul	10832		Queijo	10 <sup>3</sup>	S.cerevisiae+A.niger		B	5,00E+03	7,00E+03 A	3,00E+03
01/jul	10832		Queijo	10 <sup>5</sup>	S.cerevisiae+A.niger		B	9,30E+04	5,30E+04 A	5,60E+04
13/jul	11930	Frutas e vegetais processados	Favas	10 <sup>2</sup>	S.cerevisiae+A.niger	0,00E+00	A	<1,0E+02	<1,0E+02 D	<1,0E+02
13/jul	11930		Favas	10 <sup>3</sup>	S.cerevisiae+A.niger		A	3,30E+03	3,00E+03 D	2,90E+03
13/jul	11930		Favas	10 <sup>5</sup>	S.cerevisiae+A.niger		A	6,50E+04	7,00E+04 D	5,50E+04
14/jul	9070	Derivados leite	logurte	10 <sup>2</sup>	C.albicans+A.niger	0,00E+00	A	7,00E+02	6,00E+02 B	9,00E+02
14/jul	9070		logurte	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger		A	6,10E+03	5,50E+03 B	5,90E+03
14/jul	9070		logurte	10 <sup>5</sup>	C.albicans+A.niger		A	1,40E+05	1,30E+05 B	1,40E+05
14/jul	12004	Carne crua	Espetada de porco	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger	9,00E+02	D	1,00E+03	1,50E+03 A	9,00E+02
14/jul	12004		Espetada de porco	10 <sup>5</sup>	C.albicans+A.niger		D	6,30E+03	6,10E+03 A	6,50E+03
14/jul	12004		Espetada de porco	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger		D	8,90E+04	6,80E+04 A	6,50E+04
14/jul	12064	Refeição composta	Hamburger de grã	10 <sup>2</sup>	C.albicans+A.niger	0,00E+00	A	<1,0E+02	2,00E+02 B	<1,0E+02
14/jul	12064		Hamburger de grã	10 <sup>3</sup>	C.albicans+A.niger		A	9,50E+03	8,80E+03 B	8,90E+03
14/jul	12064		Hamburger de grã	10 <sup>5</sup>	C.albicans+A.niger		A	9,10E+04	9,00E+04 B	8,50E+04

## Anexo I

### Amostras e resultados obtidos para o cálculo do eBias para as leveduras

Data	Nº Amostra	Categoria	Origem / Produto	Gama	Material referência	Controlo Negativo	Operador D1	Valor Obtido - D1	Valor Obtido - D1 - R	Operador D2	Valor Obtido - D2
01/jun	8975	Frutas e vegetais	Cebola Tiras	10 <sup>2</sup>	C.albicans		A	2,90E+03	2,10E+03 B		3,70E+03
01/jun	8975	vegetais	Cebola Tiras	10 <sup>3</sup>	C.albicans	0,00E+00	A	5,00E+04	3,50E+04 B		3,30E+04
01/jun	8975	processados	Cebola Tiras	10 <sup>5</sup>	C.albicans		A	8,50E+04	1,30E+05 B		1,30E+05
01/jun	9011	Bebidas não alcoolicas	Sumo melão	10 <sup>2</sup>	C.albicans		B	<1,0E+02	<1,0E+02 A		5,00E+02
01/jun	9011	alcoolicas	Sumo melão	10 <sup>5</sup>	C.albicans	0,00E+00	B	7,00E+03	7,00E+03 A		6,00E+03
01/jun	9011		Sumo melão	10 <sup>5</sup>	C.albicans		B	6,80E+04	7,70E+04 A		4,30E+04
22/jun	10303	Refeicao composta	Lombo de porco c/	10 <sup>2</sup>	C.albicans		A	2,00E+02	<1,0E+02 C		<1,0E+02
22/jun	10303	composta	Lombo de porco c/	10 <sup>3</sup>	C.albicans	0,00E+00	A	3,80E+03	3,90E+03 C		3,40E+03
22/jun	10303		Lombo de porco c/	10 <sup>5</sup>	C.albicans		A	3,60E+04	3,10E+04 C		3,30E+04
23/jun	10343	Carne crua	Salsicha fresca	10 <sup>2</sup>	S.cerevisae		D	2,60E+03	3,30E+03 A		3,80E+03
23/jun	10343		Salsicha fresca	10 <sup>3</sup>	S.cerevisae	1,60E+02	D	1,50E+04	2,20E+04 A		2,60E+04
23/jun	10343		Salsicha fresca	10 <sup>5</sup>	S.cerevisae		D	1,90E+05	3,20E+05 A		2,50E+05
01/jul	10542	Bebidas não alcoolicas	Sumo romã e sabuj	10 <sup>2</sup>	C.albicans		C	3,00E+02	5,00E+02 A		<1,0E+02
01/jul	10542	alcoolicas	Sumo romã e sabuj	10 <sup>3</sup>	C.albicans	0,00E+00	C	2,90E+03	3,00E+03 A		2,10E+03
01/jul	10542		Sumo romã e sabuj	10 <sup>5</sup>	C.albicans		C	1,10E+05	1,10E+05 A		1,40E+05
01/jul	10832	Derivados leite	Queijo	10 <sup>2</sup>	S.cerevisae		B	5,00E+02	3,00E+02 A		3,00E+02
01/jul	10832		Queijo	10 <sup>3</sup>	S.cerevisae	0,00E+00	B	5,00E+03	7,00E+03 A		3,00E+03
01/jul	10832		Queijo	10 <sup>5</sup>	S.cerevisae		B	7,30E+04	4,10E+04 A		3,70E+04
13/jul	11980	Frutas e vegetais	Favas	10 <sup>2</sup>	S.cerevisae		A	<1,0E+02	<1,0E+02 D		<1,0E+02
13/jul	11980	vegetais	Favas	10 <sup>3</sup>	S.cerevisae	0,00E+00	A	2,10E+03	1,60E+03 D		1,40E+03
13/jul	11980	processados	Favas	10 <sup>5</sup>	S.cerevisae		A	4,00E+04	4,40E+04 D		3,60E+04
14/jul	9070	Derivados leite	Iogurte	10 <sup>2</sup>	C.albicans		A	7,00E+02	6,00E+02 B		9,00E+02
14/jul	9070		Iogurte	10 <sup>3</sup>	C.albicans	0,00E+00	A	4,90E+03	4,50E+03 B		4,90E+03
14/jul	9070		Iogurte	10 <sup>5</sup>	C.albicans		A	1,20E+05	1,20E+05 B		1,20E+05
14/jul	12004	Carne crua	Espetada de porco	10 <sup>2</sup>	C.albicans		D	8,00E+02	1,30E+03 A		7,00E+02
14/jul	12004		Espetada de porco	10 <sup>3</sup>	C.albicans		D	4,00E+03	4,00E+03 A		3,20E+03
14/jul	12004		Espetada de porco	10 <sup>5</sup>	C.albicans	6,00E+02	D	8,30E+04	6,10E+04 A		6,10E+04
14/jul	12064	Refeicao composta	Hamburguer de grã	10 <sup>2</sup>	C.albicans		A	<1,0E+02	3,00E+02 B		<1,0E+02
14/jul	12064	composta	Hamburguer de grã	10 <sup>3</sup>	C.albicans	0,00E+00	A	6,40E+03	6,70E+03 B		6,30E+03
14/jul	12064		Hamburguer de grã	10 <sup>5</sup>	C.albicans		A	8,00E+04	7,90E+04 B		7,40E+04

Anexo J

Amostras e resultados obtidos para o cálculo do eBias para os bolores

Data	Nº Amostra	Categoria	Origem/Produto	Gama	Material referência	Controlo Negativo	Operador D1	Valor Obtido - D1	Operador D1 - R	Valor Obtido - D2	Operador D2	Valor Obtido - D2
22/jun	10303	Refeição	Lombo de porco c/10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	A.niger		A	<1,0E+02	<1,0E+02 C	<1,0E+02		<1,0E+02
22/jun	10303	composta	Lombo de porco c/10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	A.niger		A	<1,0E+02	<1,0E+02 C	<1,0E+02		<1,0E+02
22/jun	10303		Lombo de porco c/10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	A.niger	0,00E+00	A	<1,0E+02	<1,0E+02 C	<1,0E+02		<1,0E+02
23/jun	10343	Carne crua	Salsicha fresca	10 <sup>2</sup>	A.niger		D	<1,0E+02	1,00E+02 A	<1,0E+02		<1,0E+02
23/jun	10343		Salsicha fresca	10 <sup>3</sup>	A.niger		D	2,00E+02	3,00E+02 A	2,00E+02		2,00E+02
23/jun	10343		Salsicha fresca	10 <sup>5</sup>	A.niger	0,00E+00	D	3,40E+03	2,60E+03 A	2,80E+03		2,80E+03
01/jul	10542	Bebidas	Sumo romã e sabu/10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	A.niger		C	<1,0E+02	<1,0E+02 A	2,00E+02		2,00E+02
01/jul	10542	não	Sumo romã e sabu/10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	A.niger		C	2,00E+02	2,00E+02 A	1,00E+02		1,00E+02
01/jul	10542	alcoolicas	Sumo romã e sabu/10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	A.niger	0,00E+00	C	1,80E+04	1,50E+04 A	1,40E+04		1,40E+04
01/jul	10832		Queijo	10 <sup>2</sup>	A.niger		B	1,00E+02	1,00E+02 A	<1,0E+02		<1,0E+02
01/jul	10832	Derivados	Queijo	10 <sup>3</sup>	A.niger		B	2,00E+02	4,00E+02 A	2,00E+02		2,00E+02
01/jul	10832	leite	Queijo	10 <sup>5</sup>	A.niger	0,00E+00	B	2,00E+04	1,20E+04 A	1,90E+04		1,90E+04
13/jul	11930	Frutas e	Favas	10 <sup>3</sup>	A.niger		A	<1,0E+02	<1,0E+02 D	<1,0E+02		<1,0E+02
13/jul	11930	vegetais	Favas	10 <sup>3</sup>	A.niger		A	1,20E+03	1,40E+03 D	1,50E+03		1,50E+03
13/jul	11930	processad	Favas	10 <sup>5</sup>	A.niger	0,00E+00	A	2,50E+04	2,60E+04 D	1,90E+04		1,90E+04
14/jul	9070		logurte	10 <sup>2</sup>	A.niger		A	<1,0E+02	<1,0E+02 B	<1,0E+02		<1,0E+02
14/jul	9070	Derivados	logurte	10 <sup>3</sup>	A.niger		A	1,20E+03	9,00E+02 B	1,00E+03		1,00E+03
14/jul	9070	leite	logurte	10 <sup>5</sup>	A.niger	0,00E+00	A	2,00E+04	1,30E+04 B	1,90E+04		1,90E+04
14/jul	12004		Espetada de porco	10 <sup>2</sup>	A.niger		D	3,00E+02	2,00E+02 A	3,00E+02		3,00E+02
14/jul	12004	Carne crua	Espetada de porco	10 <sup>3</sup>	A.niger		D	2,30E+03	3,00E+03 A	3,20E+03		3,20E+03
14/jul	12004		Espetada de porco	10 <sup>5</sup>	A.niger	3,00E+02	D	6,00E+03	7,00E+03 A	4,00E+03		4,00E+03
14/jul	12064		Hamburguer de grã/10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	A.niger		A	<1,0E+02	2,00E+02 B	<1,0E+02		<1,0E+02
14/jul	12064	Refeição	Hamburguer de grã/10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	A.niger		A	3,10E+03	2,10E+03 B	2,60E+03		2,60E+03
14/jul	12064	composta	Hamburguer de grã/10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	A.niger	0,00E+00	A	1,20E+04	1,20E+04 B	1,20E+04		1,20E+04