



Universidade de Aveiro
2022

**Fábio Mendes
dos Santos**

**Validação do método de avaliação da esterilidade
em conservas**



Universidade de Aveiro
2022

**Fábio Mendes
dos Santos**

**Validação do método de avaliação da esterilidade em
conservas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia alimentar realizada sob a supervisão científica da Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira, Professora Associada do Departamento de Química e Fátima Castro, Diretora Geral da Silliker Portugal S. A.

o júri

presidente

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
professor associado da Universidade de Aveiro

vogais

Prof. Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira
professora associada da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Teresa Lemos Pereira Saúde Reis
Investigadora doutorada do Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto

Agradecimentos

Após a conclusão deste estágio e conseqüentemente os dois anos de mestrado existem diversas pessoas às quais gostaria de agradecer:

Em primeiro lugar, à empresa Silliker Portugal, S. A. pela possibilidade de participar neste estágio juntamente com todos os analistas da empresa com quem tive a oportunidade de adquirir novos conhecimentos nesta área. Em particular agradeço à Dr^a. Fátima Castro por me incluir neste estágio, à Dr^a. Andreia Poças pelo acompanhamento prestado no decorrer deste, mas também ao Dr. Bruno Loureiro pela disponibilidade em prestar todos os esclarecimentos solicitados.

Em segundo lugar, à minha orientadora a professora Dr^a. Eduarda Pereira pela disponibilidade que apresentou no auxílio para a orientação e elaboração deste relatório de estágio de mestrado.

Em último lugar, agradeço à minha família que sempre me suportou e apoiou.

palavras-chave

Segurança alimentar, preservação alimentar, conservas alimentares, validação de métodos, contaminação microbiológica, prova de esterilidade

Resumo

A disponibilidade e acesso a recursos alimentares é essencial para a preservação e desenvolvimento da sociedade e estes representam um dos recursos mais rigorosamente controlados a nível mundial. Esta necessidade de alimentos levou ao desenvolvimento de diversas técnicas com o objetivo de prolongar o seu período de consumo antes que a sua degradação natural ou possíveis contaminações tornem o seu consumo um risco possivelmente fatal. Nesta vertente surgem as conservas alimentares com a capacidade de preservar uma grande porção do valor nutricional dos alimentos com uma grande acessibilidade. Estas resultam do processo de colocar um dado alimento num contentor e expô-lo a elevadas temperaturas para garantir a sua esterilidade, porém, este processo pode por vezes falhar, resultando num produto contaminado cujo consumo será um risco para a saúde pública. Assim sendo, de forma a evitar este cenário, existem empresas com o intuito de determinar se um dado produto está de acordo com a legislação em vigor de forma a ser distribuído e consumido. Esta determinação é realizada segundo metodologias adotadas ou desenvolvidas pela empresa que devem ser validadas, ou seja, definir as características do método com provas que este funciona e que o laboratório é capaz de o aplicar corretamente.

O estágio foi realizado no laboratório de microbiologia da empresa Silliker Portugal S. A., pertencente à corporação Mérieux Nutrisciences, sendo o seu objetivo a compreensão do processo de validação, segundo a legislação portuguesa em vigor e o procedimento interno da empresa, para a metodologia associada a garantir a esterilidade em conservas alimentares.

Foram analisadas 40 amostras com 66 ensaios nos quais 46 foram contaminadas artificialmente e 20 foram utilizados sem qualquer alteração. Obtiveram-se assim 70% dos ensaios com o resultado de não estéril e 30% estéril. Os parâmetros de validação resultaram numa eficiência de 100%, especificidade de 100%, taxa de falsos negativos e positivos de 0%, seletividade de 23% e sensibilidade de 100% permitindo classificar o método como validado de acordo aos critérios do laboratório.

Este trabalho reforçou a importância de conservas alimentares e a necessidade da utilização de análises microbiológicas cuja validação e implementação evidencie resultados aceitáveis e creíveis.

keywords

food preservation, food safety, canned food, microbiological contamination, qualitative methods validation, proof of sterility

Abstract

Food availability and accessibility are paramount to the survival and development of human society and as such food is considered the most carefully managed resources in the world. This food necessity resulted in the development of many different techniques with the objective of prolonging their safe consumption period and shelf-life before natural degradation or contamination by microbiological agents results in a health hazard to the consumer. As such, there is a need for simple but effective strategies and in that sense canned foods are one of the most common and readily available means since most of the nutritional value is preserved and they can last up to several years undisturbed. Canned food is the result of storing food in containers and exposing them to high temperatures until they are sterile, though this process may sometimes fail due to bacterial resistance being higher than expected or problems associated with the cans themselves, like leaks, resulting in the product being considered not fit for consumption. Due to this fact certain companies were set to analyze these products and find out if they are in accordance with the current legislation for distribution and consumption by the public. Those analyses are made through certain methodologies developed or adopted by the companies that, in their turn, need to be validated to define their characteristics, obtain proof of their performance and that the companies can perform them correctly.

This internship was realized at the microbiological laboratory of Silliker Portugal S.A., which belongs to the Mérieux Nutrisciences corporation, with the intent of understanding the process of validation, following international and the company guidelines, towards methods related to guaranteeing the commercial stability of canned food.

40 samples and 66 tests were carried out in which 46 were artificially contaminated and 20 were not. As such, 70% of the tests were classified as non-sterile and 30% as sterile. The validation parameters resulted in 100% efficiency, 100 specificity, a rate of 0% to false negatives and positives, selectivity of 23% and sensibility of 100%. As such, the sterility method can be classified as validated in accordance with the criteria established by the laboratory.

The developed work reinforced the importance of canned food and the necessity of utilizing microbiological analysis whose validation and implementation show credible and acceptable results

Lista de Tabelas

Tabela 1: Gama de pH e classificação dos diferentes tipos de conserva (Holdsworth e Simpson, 2007).....	13
Tabela 2: Definição do conceito de "validação" segundo a ISO 9000:2005, ISO/IEC 17025:2005 e VIM (Eder e Hosnedl, 2005; ISO/ IEC 17025:2005).	24
Tabela 3: Parâmetros de validação microbiológica qualitative (Silliker, 2020).	26
Tabela 4: Classificação das diferentes conservas alimentares analisadas segundo o estabelecido pela ISO-16140.....	33
Tabela 5: Conservas analisadas durante o estágio com o respetivo número, ensaios realizados, o tipo de produto e organismo utilizado para a contaminação.	33
Tabela 6: Caracterização das 40 amostras e 66 ensaios para validação da esterilidade e estabilidade.	45
Tabela 7: Resultados obtidos nos 66 ensaios para validação do método da esterilidade (NP-2309-2) e estabilidade (NP-4404-1) (Adaptado de Silliker,2020).	49
Tabela 8: Resultados obtidos nos 66 ensaios para validação do método da esterilidade (NP-2309-2) e estabilidade (NP-4404-1) para avaliação dos parâmetros (Adaptado de Silliker,2020).	49
Tabela 9: Parâmetros utilizados para validação do método e respetivos cálculos.....	49
Tabela 10: Parâmetros observados nas 40 amostras de conservas para avaliação da estabilidade segundo a NP-4404-1:2002.....	51
Tabela 11: Resultados para a as 40 amostras analisadas segundo o definido na norma NP-2309-2:1988.....	53

Lista de Figuras

Figura 1: Logótipo da “Mérieux NutriSciences” (Mérieux NutriSciences, 2021).	2
Figura 2: Localizações atuais de laboratórios pertencentes à “Mérieux NutriSciences” (Mérieux NutriSciences, 2021).....	3
Figura 3: Instalações da Silliker Portugal, S.A. em Vila Nova de Gaia, Canelas.....	4
Figura 4: Organograma da Silliker.	5
Figura 5: Exemplar das latas de aço utilizadas nas primeiras fases da preservação de alimentos (IFAC).	9
Figura 6: Crescimento e setores do mercado de conservas alimentares nos Estados Unidos desde 2014 até o esperado em 2025 (Grand View Research, 2018).	10
Figura 7: Diagrama das etapas de produção de uma conserva (Holdsworth e Simpson, 2007). ..	11
Figura 8: Coloração de Gram em <i>Bacillus cereus</i> (Food safety Council).	29
Figura 9: Coloração de Gram em <i>Clostridium perfringens</i> (Grupo EP).....	29
Figura 10: Coloração de Gram para <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (Ionut et al. 2019).....	30
Figura 11: Imagem microscópica de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (Kurtzman et al., 2011).	31
Figura 12: Coloração de Gram de <i>Escherichia Coli</i>	31
Figura 13: DPCS de vários microrganismos.....	32
Figura 14: Medição do pH para a amostra 34 após incubação a 37°C e 55°C respetivamente..	36
Figura 15: Amostras 19,20 e 21 após incubação a 55 °C e 37 °C respetivamente.....	37
Figura 16: Meios de cultura utilizados para conservas de categoria 1 (pH>4,5). Na figura a) podem ser observados os meios tioglicolato, DTA, ADT e ECL de trás para a frente estando presents dois suportes para ensaios a 37 e 55 °C. A figura b) representa um suporte dos meios ADT e ECL onde os tubos da frente permaneceram a incubar durante 6 dias enquanto os de trás serviram para a repicagem de meios líquidos.	41
Figura 17: Meio de pesquisa de <i>Bacillus Coagulans</i>	42
Figura 18: Meios utilizados para amostras de categoria 2 (pH<4,5) não incluindo produtos à base de tomate. Os três tubos de meio líquido e meios sólido correspondem aos meios caldo MRS e MRS agar respetivamente. As 5 placas foram utilizadas para plaqueamento com meio Cooke Rose Bengal.	43
Figura 19: Crescimento de <i>Clostridium perfringens</i> nos meios Tioglicolato (a), DTA (b) e ECL nas amostras 3 (c),33 (d) e 20 (e). Todas as amostras imagens para ECL são após a repicagem a partir de tioglicolato.	55
Figura 20: Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> na amostra 1 nos meios ECI (a) e ADT (b) pré repicagem a 37 °C. Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> na amostra 1 nos meios ECI (c) e ADT (d) pré repicagem a 55 °C.	56
Figura 21: Comparação na amostra 38 entre meio DTA a 37 °C (a) e 55 °C (b) e meio tioglicolato a 37 °C (c) e 55 °C (d).	57
Figura 22: Amostra 40 após nos meios ADT (a,c) e ECL (b,d) após incubada a 37 °C (a, b) e 55 °C (c,d).	58
Figura 23: Amostras 26, 27 e 27 contaminadas com <i>L. fermentum</i> após incubação a 37 °c (a) e 55 °C (b).....	59
Figura 24: Amostra 34 após incubação nos meios MRS ágar (a), ADT (b), ECL (c) e caldo MRS (d).	59
Figura 25: Meio Thermoacidurans Ágar para a amostra 34 incubada a 37 °C.	60
Figura 26: Crescimento de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> no meio Cooke Rose Bengal.	61

Lista de abreviaturas

ADT - Agar Dextrose triptose

APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo

C - Conforme

DPCS - Daily Control Process Sample

DTA - Dextrose triptose amido

ECL - Extrato de carne e levedura

EGI - Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda.

ICH - Conselho Internacional para Harmonização dos Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)

IEC - Comissão Eletrónica Internacional (*International Electrotechnical Commission*)

IPAC - Instituto Português de Acreditação

ISO - Organização Internacional para Padronização (*International Organization for Standardization*)

MAP - *Modified Atmosphere Packaging*

N.C. - Não conforme

N. A. - Não aplicável

PCQ - Procedimento de Controlo de Qualidade

SGQ - Sistema de Gestão da Qualidade

SHZ - *Slow Heating Zone*

UFC - Unidades de Formação de Colónias

UHT - *Ultra High Temperature*

VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia

Índice

1. Caracterização da empresa do Estágio	2
2. Objetivos do estágio	6
3. Enquadramento do tema de Estágio	7
3.1. Preservação de alimentos	7
3.2. Produção de conservas alimentares	10
4.2. Legislação portuguesa	22
4.3. Procedimento de Controlo de qualidade 33.12	23
5. Validação de métodos	23
5.1. Definições de validação e verificação	23
5.2. Importância da validação de um método	25
5.3. Parâmetros de validação	25
6. Caracterização dos organismos de referência	28
7. Materiais e métodos	32
7.1. Amostragem	32
7.2. Prova de estabilidade	35
7.3. Prova de esterilidade	36
7.3.1. Conservas de $\text{pH} \geq 4,5$	37
7.3.2. Conservas de $\text{pH} < 4,5$	38
7.4. Preparação e composição dos meios de cultura	39
7.4.1. Meio de cultura de Tioglicolato	39
7.4.2. Meio de cultura caldo dextrose triptose amido (DTA)	40
7.4.3. Meio de cultura caldo agar dextrose triptose (ADT)	40
7.4.4. Meio de cultura extrato de carne e levedura (ECL)	41
7.4.5. Meio de cultura sólido de Man, Rogosa e Sharpe (MRS)	41
7.4.6. Meio de cultura líquido de Man, Rogosa e Sharpe (MRS)	42
7.4.7. Meio de cultura para pesquisa de <i>Bacillus Thermoacidurans</i> (<i>B. coagulans</i>)	42
7.4.8. Meio de cultura Cooke Rose Bengal	43
8. Resultados e discussão	44
8.1. Resultados da amostragem para o método da esterilidade e estabilidade	44
8.2. Parâmetros de validação	47
8.2.1. Eficiência	47
8.2.2. Especificidade	47
8.2.3. Falsos negativos e falsos positivos	48
8.2.4. Seletividade	48
8.2.5. Sensibilidade	48
8.2.6. Parâmetros gerais	49
8.3. Validação segundo a ISO-16140-3: 2021	50

8.4. Prova de estabilidade.....	51
8.5. Prova de esterilidade.....	53
9. Conclusão.....	62
10. Bibliografia.....	63
Anexos.....	69

1. Caracterização da empresa do Estágio

A “Mérieux NutriSciences” é uma empresa independente de prestação de serviços e fornecedora líder que se encontra ligada a várias áreas do setor agroalimentar cuja visão e valores assentam na proteção da saúde dos consumidores disponibilizando uma grande variedade de serviços analíticos e de consultoria para as indústrias do setor alimentar e da nutrição. Assim sendo, a sua visão consiste em colocar a saúde e bem-estar dos consumidores no centro da sua atividade e oferecer o melhor serviço aos clientes. Desta forma visa a melhoria da saúde pública garantindo a segurança e qualidade de uma vasta gama de produtos incluindo alimentares, agroquímicos, cosméticos, farmacêuticos, bens de consumo e nas áreas da água e ambiente (Mérieux NutriSciences, 2021). A sua visão também consiste na aplicação e desenvolvimento de 4 pontos principais nomeadamente: inovação, desenvolvimento internacional, soluções digitais e tecnologias avançadas. Em termos de valores, a empresa valoriza a sua reputação como líder global baseando tal nas suas práticas honestas, legais e éticas e desenvolvendo as suas atividades com integridade e fiabilidade. Entre os seus valores, destacam-se como a base da empresa: a integridade promovendo a ética, honestidade, trabalho em equipa e confiança, a excelência sendo esta a promoção do conhecimento científico e foco no desempenho, a responsabilidade que demonstra o compromisso, confiança e domínio nas obrigações da empresa e por fim a iniciativa incentivando as ações com flexibilidade, proximidade, inovação, reatividade e uma abordagem proativa (Mérieux NutriSciences, 2021). No dia 18 de outubro de 2021 a empresa anunciou um novo logótipo e uma nova estratégia para reforçar a sua dedicação ao lema “Better Food, Better Health, Better World” reforçando a sua missão destinada à proteção da saúde pública e à qualidade esperada dos seus serviços. Esta mudança pretende reforçar o foco da empresa em melhorar produtos alimentares e procurar soluções eficientes para problemas atuais e futuros na cadeia de abastecimento alimentar desde a análise microbiológica até auditorias, testes sensoriais e consultoria. Desta forma, será possível fornecer aos seus clientes soluções personalizadas para as suas necessidades mais complexas. Ao novo logótipo (Figura 1) foi também adicionado a cor verde e azul para salientar a sua dedicação à sustentabilidade alimentar e ao futuro (Mérieux NutriSciences, 2021).



Figura 1: Logótipo da “Mérieux NutriSciences” (Mérieux NutriSciences, 2021).

O controlo da qualidade alimentar é uma atividade fundamental para garantir a saúde pública e segurança da população e considerando o volume de produtos disponibilizados para

compra, todos os dias esta atividade torna-se um desafio que deve ser encarado com a maior responsabilidade e seriedade possível.

A empresa teve o seu início com Marcel Mérieux, um estudante de Louis Pasteur, que fundou em 1897 o "Institut Mérieux" que se dedicava inicialmente às vacinas humanas e veterinárias. Em 1967, John H. Silliker cria em Chicago a empresa Silliker destinada à segurança alimentar e qualidade. A Silliker seria adquirida e incorporada em 1997 pelo "Institut Mérieux", com a expansão deste para outros setores, e mudou o seu nome em 2011 por aquele que é reconhecida atualmente: "Mérieux NutriSciences". Atualmente a companhia encontra-se sediada em Chicago e apresenta um crescimento rápido com mais de 100 laboratórios em 27 países (Figura 2) estando incluídos nestes França, Itália, Singapura, Arábia Saudita, Portugal e outros (Mérieux NutriSciences, 2021).



Figura 2: Localizações atuais de laboratórios pertencentes à "Mérieux NutriSciences" (Mérieux NutriSciences, 2021).

Em Portugal (Figura 3), a empresa exerce sob o nome de Silliker Portugal, S.A e o destaque da sua atividade é essencialmente o setor agroalimentar. Surgiu em 1992 com o nome de "Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda." (EGI) numa altura onde a necessidade de aumentar a qualidade alimentar crescia com uma oferta limitada de serviços de assessoria. Respondendo a esta necessidade do mercado, a EGI assumiu rapidamente uma posição líder à escala nacional (Mérieux NutriSciences, 2021). Em 1993 a EGI integrava o Sistema Português da Qualidade através da acreditação do laboratório por parte do Instituto Português de Acreditação (IPAC), o organismo nacional de acreditação. A acreditação consiste no reconhecimento da competência técnica de uma entidade para efetuar atividades tais como ensaios, calibrações, certificações e inspeções de forma a avaliar se um dado processo, serviço ou produto cumpre com os requisitos que lhe são aplicáveis (IPAC). Neste caso, A Silliker Portugal, S.A está acreditada através do Certificado de Acreditação n.º L0087 (IPAC) . Dado o reconhecimento da importância das características organolépticas dos produtos e da sua

caracterização foi criado, em 2000, o laboratório de análise sensorial. Em 2008 a multinacional Silliker adquire 86 % do capital, provocando a transição da empresa para o nome Silliker Portugal, S.A, com a aquisição de mais 10 % em 2011.



Figura 3: Instalações da Silliker Portugal, S.A. em Vila Nova de Gaia, Canelas.

As atividades da empresa e respetivos serviços estão distribuídas por várias áreas (Figura 4) sendo as três principais as análises:

- **Físico-químicas:** dividido nos laboratórios de físico-química e métodos instrumentais de análise. Análises relativas à informação nutricional, contaminantes, alergénios e outros.
- **Microbiológicas:** identificação de microrganismos patogénicos e ensaios qualitativos e quantitativos.
- **Ambientais:** Análise a águas residuais, águas de consumo, solos, lamas, efluentes líquidos e gasosos entre outros.

Para além destes ainda apresenta um conjunto diverso de serviços estando incluídos nestes:

- **Consultorias:** avaliar e validar sistemas de forma a melhorar a segurança e qualidade alimentar. Especializam-se em áreas tais como sistemas de gestão da qualidade e segurança alimentar, boas práticas de fabrico, gestão de alergénios e outros.
- **Auditorias e inspeções:** permitem identificar problemas antes da sua ocorrência o que é fundamental na área alimentar. Garantem que fornecedores, produtores, distribuidores e empresas de serviços no setor alimentar seguem as regulações estabelecidas assegurando a melhor qualidade e segurança aos produtos destes

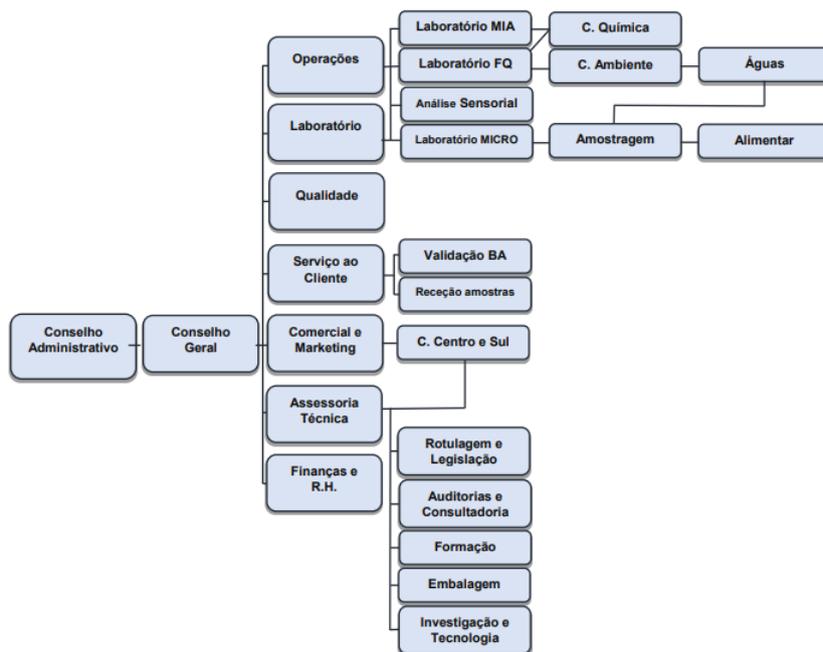


Figura 4: Organograma da Silliker.

O Estágio será realizado no laboratório de microbiologia responsável pela deteção de organismos patogénicos tais como "*Escherichia Coli*", "*Salmonella*" ou "*Listeria*" em produtos alimentares de natureza variada desde produtos lácteos, cárneos e pescado até confeitaria. Estas análises permitem certificar aos clientes da empresa que esses alimentos são seguros para distribuição e consumo sendo um serviço essencial para garantir a qualidade dos mesmos e a prevenção de surtos na população

2. Objetivos do estágio

Os objetivos que se pretendem alcançar durante a realização deste estágio são:

- Compreender o processo de validação e verificação de métodos segundo normas portuguesas em vigor e os processos adotados pela empresa;
- Verificar se as conservas alimentares estão de acordo aos parâmetros de qualidade estabelecidos para comercialização e consumo seguro.

As conservas alimentares representam uma parte importante da dieta de uma porção significativa da população humana com um aumento esperado nas próximas décadas pelo que a deteção de contaminantes que afetem a saúde pública, seja esta de forma fatal ou não, é uma das atividades cuja regulação deve ser feita de uma forma cuidadosa e com parâmetros rígidos.

3. Enquadramento do tema de Estágio

3.1. Preservação de alimentos

O acesso a alimentos é uma das maiores necessidades de qualquer organismo, incluindo o Homem. Em tempos pré-históricos, a preservação alimentar seria uma preocupação negligenciável uma vez que o seu consumo era realizado segundo a necessidade limitando o excedente que poderia ser conservado. Esta tendência começou a mudar à medida que as culturas de caçadores-recoletores se adaptaram a um estilo de vida sedentário e a agricultura e a criação de gado se tornaram atividades primárias. Estas resultaram num excesso de alimentos cuja preservação permitira assegurar reservas em anos onde as colheitas fossem insatisfatórias ou ocorresse um surto entre os animais resultando na sua morte e os consequentes riscos do seu consumo. Assim sendo, os processos de conserva começaram em métodos de tentativa e erro sendo refinados a partir desse ponto. Entre os mais antigos destaca-se a utilização de fogo e do próprio Sol e, nas regiões onde possível, a utilização de neve e gelo para refrigeração. As estratégias mencionadas anteriormente eventualmente tornaram-se as mais praticadas e eficientes mantendo-se maioritariamente inalteradas durante milhares de anos.

De todos os métodos tradicionais, a cozedura é a técnica mais antiga, com vestígios da sua prática desde 50000 a.C., para a preservação de alimentos uma vez que elimina microrganismos patogénicos mantendo o produto edível. Dentro da cozedura existem inúmeras variações dependendo do tipo de alimento e local onde é realizado, mas atualmente já não é aplicada para a preservação a longo prazo, considerando as estratégias mais eficientes disponíveis, mas sim para melhorar as propriedades organolépticas de alimentos e facilitar a sua digestão. Para além deste, outros métodos com origem na antiguidade incluem: a utilização do sal, a secagem pelo fogo, a ausência de água nos alimentos que inibe o crescimento e proliferação de microrganismos tanto em produtos animais como vegetais (Joardder et al., 2019; Wilson, 1991), e a fumagem que consiste na exposição de um alimento ao fumo. A secagem e a fumagem eram pouco distintas pois a forma de exclusão do fumo do fogo durante o processo de secagem era desconhecida até que novas tecnologias permitiram a sua separação. Atualmente, a secagem ainda é um processo utilizado para a conservação de alimentos, com destaque para os países em desenvolvimento uma vez que países desenvolvidos apresentam infraestrutura para técnicas mais modernas e seguras sendo esta apenas utilizada por razões culturais, especialmente carnes e peixes no processo de cura enquanto a fumagem perdeu parte da sua relevância na preservação alimentar, mas é popular pelo sabor único que resulta da sua utilização. A utilização de sal encontra-se fortemente associada à secagem devido à reação de osmose desencadeada pela sua adição e ao facto de que grande parte dos microrganismos é incapaz de viver em ambientes altamente salinos. Juntamente com a decapagem e a compressão todos estes

métodos apresentam uma larga história de utilização por diversas sociedades e ainda se encontram em uso.

Os impactos do desperdício alimentar são cada vez mais extensos provocando graves problemas a nível ambiental, social e na saúde individual e coletiva pelo que este fenómeno deve ser minimizado. Desta forma, a aplicação moderna de tecnologias associadas à preservação implica 3 princípios básicos: i) a inativação de microrganismos que de alguma forma contaminem o alimento, ii) a prevenção ou atraso do seu crescimento caso estes não tenham sido desativados e iii) a inativação de enzimas. Considerando estes princípios, certas técnicas começaram a ser destacadas e desenvolvidas por serem a forma mais segura de preservar alimentos e as mais economicamente viáveis. Tal é o caso na utilização de temperaturas baixas, sendo atualmente as estratégias mais populares a nível global devido à sua capacidade de inibir o metabolismo microbiano, a reprodução dos microrganismos e reações químicas (Delgado e Sun, 2001) permitindo um longo tempo de prateleira e mantendo o valor nutricional do produto (Fennema, 1997). O nome destes processos varia segundo a gama de temperaturas utilizada sendo que, temperaturas abaixo de -18°C referem-se a congelamento, a refrigeração ocorre entre -1°C e 4°C e, em casos particulares, super-refrigeração consistindo esta em preservar um alimento a temperaturas abaixo do seu ponto de refrigeração. Estas técnicas envolvem frequentemente a associação a outras tais como o empacotamento de forma a reforçar a proteção fornecida ao alimento reduzindo danos físicos que possam acontecer durante o transporte ou armazenamento e diminuam os danos provocados pela exposição a fatores ambientais tais como humidade, odores, luz e outros. As embalagens alimentares possuem uma grande diversidade de propriedades segundo o material do qual são compostas e o tipo de produto ao qual se pretende a que sejam aplicadas. A maioria destas é composta por polímeros como polietileno ou polipropileno, mas tem-se assistido ao crescimento da "*modified atmosphere packaging*" (MAP) consistindo no controlo da atmosfera na embalagem de forma a estender o tempo de vida do produto (Robertson, 2016). Esta variação é geralmente aplicada em produtos altamente perecíveis que ainda realizam respiração como frutas e vegetais, mas também carnes de forma a manter uma aparência mais adequada aos consumidores e implica a diminuição de oxigénio e a sua substituição por outros gases tais como dióxido de carbono ou azoto de forma a prevenir a oxidação (Boskou e Elmadfa, 2019). O empacotamento a vácuo frequentemente utilizado representa uma abordagem semelhante com a utilização de embalagens de baixa permeabilidade e conseqüente difusão lenta do oxigénio.

A **conservação química** é outra técnica relativamente recente onde substâncias, como por exemplo o ácido ascórbico, ácido cítrico ou sorbato de potássio, que são conservantes comuns, são utilizados para evitar a degradação de alimentos.

As técnicas que usam **tratamentos térmicos**, por exemplo aplicadas aos produtos enlatados são uma das estratégias mais comuns para a preservação de alimentos e um dos métodos mais utilizados globalmente pois permitem conservar uma grande variedade de produtos.

As técnicas referidas constituem algumas das estratégias mais comuns à escala global, mas a variedade de procedimentos é mais extensa e variações existem segundo o local onde é realizado e a tecnologia e recursos financeiros disponíveis à entidade responsável pela sua administração.

O acesso à alimentação nutritiva é considerado um direito humano e é um requerimento para a prevenção e tratamento de doenças crónicas e relativas a deficiências (Ohlhorst et al., 2013). Para tal, é necessário manter um equilíbrio entre o consumo de calorias e nutrientes, mas a capacidade da população de alcançar esse balanço está dependente de um conjunto de fatores genéticos, socioeconómicos e estilo de vida. Neste aspeto, conservas alimentares são uma forma simples, fácil e conveniente de obter produtos com elevado valor nutritivo com tempo de prateleira longo.

A conservação de alimentos em latas ou frascos consiste essencialmente em fechar hermeticamente um alimento num contentor e impedir o desenvolvimento de microrganismos patógenos através da aplicação de calor. Esta técnica foi inicialmente desenvolvida por Nicholas Appert (IFAC) em 1809 no contexto das guerras napoleónicas e a pedido do governo francês. Este percebeu que isolar um alimento num frasco submetendo-o a altas temperaturas impedia a sua degradação sendo que o porquê deste fenómeno só seria explicado por Louis Pasteur décadas depois. A versão original deste processo era lenta e envolvia a utilização de frascos de vidro apresentando problemas logísticos no transporte destes e o risco da explosão do próprio frasco (IFAC). Em 1811 Phillipe de Girard desenvolveu as latas de aço (Figura 5) e após venda da patente Bryan Donkin conseguiu obter a produção a larga escala embora o processo ainda fosse lento e o produto final fosse demasiado caro para a população civil pelo que era principalmente vendido e distribuído a instituições tais como exércitos (IFAC).



Figura 5: Exemplar das latas de aço utilizadas nas primeiras fases da preservação de alimentos (IFAC).

A popularidade das conservas aumentou devido à sua versatilidade e utilização em expedições e conflitos, pela sua exposição a soldados que voltariam às suas vidas civis. Isto permitiu às empresas expandir conservas à população geral. A sua utilização durante a primeira e a segunda guerra mundial cimentou a sua atual posição atual no dia-a-dia das sociedades humanas (National Canners Association, 1963)

Atualmente, o mercado relativo às conservas apresenta valores na ordem dos milhares de milhões de dólares, com um valor estimado em 2018 de 91,4 mil milhões de dólares americanos e um crescimento esperado até 2026 para 124 mil milhões (Allied Market Research, 2020). Destes, o segmento das carnes e produtos marinhos representa mais de um terço do volume total do mercado com o restante dirigido a frutas, vegetais, leguminosas, molhos e outros (Figura 6). Em termos geográficos o maior consumo de conservas é observado na Europa com o maior aumento nas próximas décadas esperado na Ásia e no Pacífico resultantes do desenvolvimento da classe média (Allied Market Research, 2020).

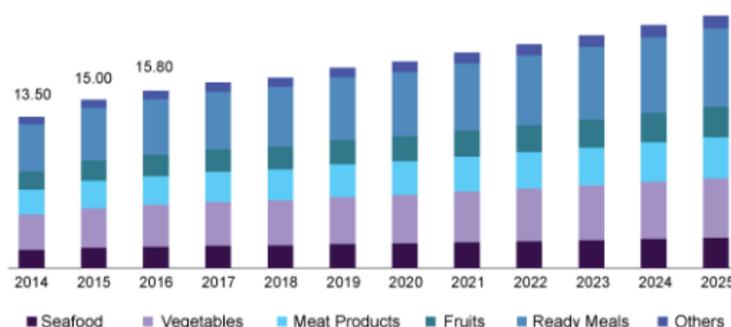


Figura 6: Crescimento e setores do mercado de conservas alimentares nos Estados Unidos desde 2014 até o esperado em 2025 (Grand View Research, 2018).

3.2. Produção de conservas alimentares

Abordando o processo através do qual conservas alimentares são produzidas verifica-se que este é essencialmente um processo térmico. Este pode ser dividido em 2 estratégias: **tratamento térmico leve**, correspondendo ao branqueamento e à pasteurização, onde o produto não é esterilizado; ou seja, microrganismos e enzimas são destruídos, mas não totalmente sendo que outros com uma resistência superior à temperatura utilizada ainda podem proliferar nas condições certas (Fellows, 2017). Por esta razão, a refrigeração de alimentos tratados desta forma é frequentemente utilizada de forma a atrasar essa mesma proliferação.

A outra estratégia é o **tratamento térmico severo** utilizado para obter conservas. Este processo requer um conjunto de etapas: inicialmente, o alimento sofre um pré-tratamento de forma a evitar contaminações durante o procedimento consistindo na lavagem do produto em

tanques de água ou jatos de alta pressão (Britannica, 2021) ; nesta etapa são aplicados tratamentos térmicos leves como aqueles mencionados anteriormente, sendo um dos exemplos mais significativos os vegetais que são quase todos submetidos a branqueamento para degradar enzimas indesejáveis, mas também permitir um empacotamento mais eficiente pelo amolecimento dos seus tecidos. Outros processos aplicados podem incluir a cozedura, congelamento, secagem e radiação ionizante. O produto é depois colocado num contentor (lata) com um líquido, geralmente água, salmoura, xarope e conservantes como ácido ascórbico de forma a substituir o máximo de ar possível seguido por um processo de exaustão mecânica ou térmica em vácuo onde o restante ar é removido (através da expansão do alimento (Britannica, 2021)); segue-se uma lavagem à parte externa do contentor com detergente para remover restos de gordura ou outras matérias na embalagem e finalmente a selagem do contentor (Britannica, 2021). Só após estas fases é que o processo térmico é iniciado com a exposição da lata a uma dada temperatura e tempo, ambos fatores dependentes do produto, tamanho da lata, taxa de penetração da temperatura no centro da lata ou pH do alimento, mas obrigatoriamente o suficiente para garantir a esterilidade (Jackson et al., 1979).

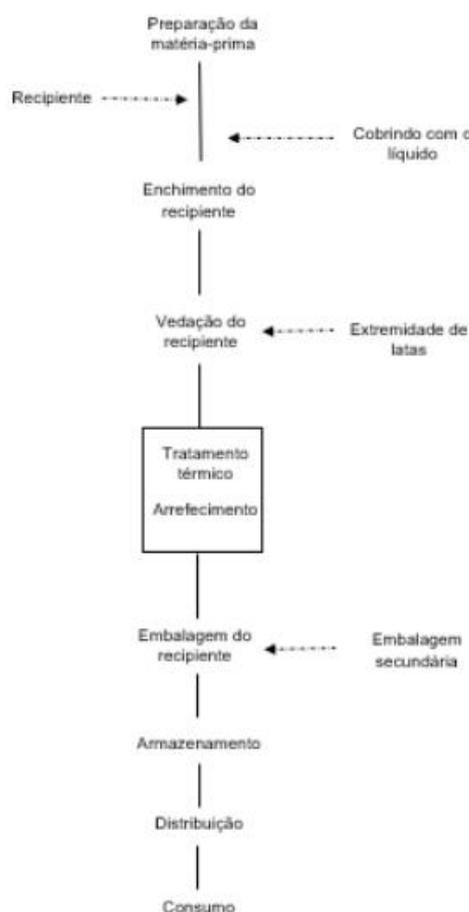


Figura 7: Diagrama das etapas de produção de uma conserva (Holdsworth e Simpson, 2007).

A transferência de calor pode ocorrer através de três métodos, condução, convecção ou uma combinação de ambos. A condução ocorre pela transferência de energia de partículas mais energéticas, situadas na zona aquecida, para aquelas num estado de energia inferior e na convecção essa energia é movimentada pelas correntes que se formam no líquido ou gás devido à dilatação térmica desse meio, conseqüente menor densidade e a tendência dessa parte aquecida do meio a ascender (Emanuele, 1946).

Estas formas de transferência de calor representam um fator importante na esterilização devido ao tipo de meio que se pretende esterilizar. Para conservas com uma proporção líquida significativa, a convecção será a forma predominante da penetração do calor tornando o processo de esterilização rápido, mas para alimentos de caráter mais sólido ou pastoso a condução será a forma de transferência comum levando a um processamento lento. Assim, a humidade do produto representa uma variável a ter em conta na esterilização, quanto menor for esta menor será a condutividade térmica observada (Hallman, 1932).

Retomando os fatores dos quais o processamento térmico está dependente, todas as esterilizações devem basear-se no ponto crítico da lata apresentada, também chamado "Slow Heating Zone" (SHZ). No caso de alimentos onde a condução seja a forma predominante de transferência, o ponto crítico tende a manter-se no centro geométrico da lata. Alimentos tais como atum enlatado, xaropes espessos e purés são geralmente considerados como puramente aquecidos por condução. Para conservas líquidas a determinação do ponto crítico requer uma análise e previsão do fluxo do meio e perfis de temperatura, porém geralmente este tende a deslocar-se para as zonas inferiores da lata. A relevância do ponto crítico encontra-se no facto de este ser o local a maior distância da periferia da lata resultando em mais tempo necessário para a penetração do calor, o que por sua vez é influenciado pelo tipo de material pelo qual a lata é composta e a sua capacidade como condutor térmico. Exemplificando, uma lata metálica apresentará uma capacidade de transferir calor superior a um frasco de vidro pelo que o tempo de esterilização deste último será maior uma vez que penetração do calor até o seu ponto crítico demorará mais tempo. A composição do alimento também influencia esta característica uma vez que alimentos ricos em proteínas, açúcares e gordura apresentam um efeito protetor nos microrganismos diminuindo a penetração do calor pelo que a esterilização desses deve ser mais intensa. A resistência dos microrganismos às temperaturas à qual são submetidos depende do meio onde se encontram, da forma em que se encontram e das características do meio, neste caso o alimento, assim da atividade da água, disponibilidade de hidratos de carbono, sais e pH. Este último é de maior importância pois afeta o comportamento dos microrganismos: a resistência térmica destes a pH neutro é superior à observada em pH baixos pelo que alimentos de caráter ácido requerem tratamentos menos extensos para alcançar a esterilidade. Alimentos são classificados nesta categoria como ácido ($\text{pH} < 4,5$) e não ácido ($\text{pH} \geq 4,5$) e tal influência a capacidade de organismos de germinar.

- **Categoria 1 - alimentos de baixo teor ácido (pH \geq 4,5):** representam grande parte das conservas alimentares pertencendo a esta categoria alimentos como carnes, peixe, leite e vegetais. Microrganismos neste tipo de alimentos tendem a possuir uma resistência térmica superior;
- **Categoria 2 - alimentos ácidos (pH $<$ 4,5):** constituído predominantemente por frutos tais como maracujá, pêsego, pickles e outros. O processamento térmico deste tipo de alimentos é geralmente mais baixo uma vez que o desenvolvimento de microrganismos nestes é raro com a exceção de leveduras, bolores e bactérias do ácido láctico.

Exemplificando, esporos de "*Clostridium botulinum*" geralmente não germinam a pH abaixo de 4,5 enquanto abaixo de pH 4 a germinação de esporos bacterianos é improvável. Assim sendo, o pH do produto deve ser considerado para o processamento do alimento em questão.

Na Tabela 1 estão indicadas as gamas de pH para os diferentes tipos de conservas alimentares:

Tabela 1: Gama de pH e classificação dos diferentes tipos de conserva (Holdsworth e Simpson, 2007).

Alimento	Gama de pH	Classificação pH
Peixe	4,6-7,0	
Atum	4,6-6,0	Alimento com baixo teor de ácido
Salmão	6,1-6,5	
Carne	4,8-6,1	
Vitela	5,8-6,0	Alimento com baixo teor de ácido
Frango	6,0-6,3	
Sopas	4,0-6,5	
Tomate	4,2-5,2	Alimento com baixo teor de ácido
Vegetais	4,7-6,0	
Frutas	2,5-6,5	
Maçã	3,3-3,5	
Pêssego	3,4-4,2	Alimento ácido
Ananás	4,0-5,1	
Tomate	4,1-4,4	
Azeitonas maduras	5,9-7,3	Alimento com baixo teor de ácido
Pickles azedo	3,0-3,5	Alimento ácido
Vegetais	4,6-8,0	
Feijão/molho tomate	5,2-6,4	Alimento com baixo teor de ácido
Vegetais misturados	5,4-5,6	
Ervilhas	5,6-6,6	

Através de autoclaves a gama de temperaturas utilizadas pode situar-se entre os 116 - 121°C ou temperaturas acima destas por exemplo para leite UHT para permitir a eliminação de

esporos ou toxinas particularmente resistentes, com principal destaque para "*Clostridium botulinum*" devido à sua letalidade se consumido. As etapas finais do processo incluem o arrefecimento da lata, lavagem, secagem e testes pós-processamento para garantir a sua esterilidade antes da rotulagem e distribuição. Algumas substâncias poderão ser adicionadas durante o procedimento como no caso do cálcio para manter a textura do alimento estável. No final, o objetivo alcançado será um tempo de prateleira estendido, superior a 6 meses, e esterilidade comercial definido como o grau de esterilização ao qual todos os patógenos e organismos formadores de toxinas foram destruídos, tal como todos os outros tipos de organismos, que se presentes em condições normais de manipulação e armazenamento, poderiam proliferar provocando a degradação dos alimentos. Esterilidade comercial não implica a eliminação total dos microrganismos pois um número reduzido de esporos resistentes à temperatura pode permanecer, mas é incapaz de desenvolver-se em condições normais (Potter e Hotchkiss, 1995). Um dos aspetos mais importantes das conservas alimentares é a lata ou contentor onde o alimento é colocado juntamente com o tipo de material do qual esse é composto. O principal objetivo do contentor é proteger o alimento de impactos físicos, contaminações externas por fatores biológicos como água ou oxigénio, armazenamento adequado, mas também providenciar informação relativa ao seu conteúdo e utilidade e conveniência para o consumidor. Embalagens podem dividir-se em três categorias: primárias, secundárias e terciárias. Estas categorias variam segundo o grau de contacto com o alimento; deste modo, as primárias apresentam contacto direto com o produto pertencendo às conservas alimentares. As secundárias, como as caixas de papelão ondulado, não contactam diretamente com o conteúdo e é onde a embalagem primária está armazenada e as terciárias, contentores ou plástico, onde embalagens secundárias estão agrupadas para distribuição.

A escolha do tipo de material a utilizar para melhor preservar um produto está sujeita a uma grande variedade de variáveis incluindo o custo, compatibilidade com o produto, resistência às condições de esterilização, preferência dos consumidores, velocidade de produção, entre outros (Sloan, 1996). No caso de conservas alimentares, o material mais comum é o metal seguido por alumínio e em alguns casos vidro. As latas de metal podem ser revestidas por latão no seu interior ou então alumínio ou cromo recebendo nestes casos a designação de "*tin-free steel*". Para além disso, revestimento orgânico também é adicionado ao interior e exterior sob a forma de filmes de 1 a 10 μm (Geuke, 2016) para minimizar as interações e consequentes reações químicas entre o alimento e o material onde está contido. Existe uma grande variedade de revestimentos que diferem entre o seu preço, composição química e propriedades, mas alguns exemplos dos mais comuns são as resinas epóxi, oleorresinas, revestimentos de vinil e resinas fenólicas. Porém, um dos aspetos relevantes relativamente às conservas alimentares é a capacidade de migração de compostos principalmente bisfenol A, éter bisfenol A diglicílico e os

seus derivados (Biederman e Grob, 1998) que possivelmente apresentam potencial carcinogénico e consequências ao nível cardiovascular, neurológico e metabólico (EFSA 2015; Gao e Wang, 2014). Revestimentos epóxi apresentam um conjunto de vantagens, incluindo compatibilidade extensa com uma grande gama de alimentos, elevada estabilidade e baixos custos. Alternativas à base de acrílica e poliéster existem juntamente com outros sistemas para minimizar a migração, mas nenhum deles preenche os requisitos para substituir resinas epóxi totalmente devido ao seu preço ou baixa compatibilidade reduzindo o tempo de prateleira das conservas.

Tal como mencionado anteriormente, as conservas permitem a uma parte significativa da população aceder a alimentos a um preço mais acessível e com um tempo de armazenamento longo, porém a sua qualidade é frequentemente considerada inferior quando comparada a alimentos frescos. Esta reputação está associada ao tratamento térmico ao qual as conservas estão sujeitas e aos efeitos que essa temperatura exerce sobre a textura, cor, sabor e conteúdo nutricional do alimento. Exemplificando, certas vitaminas solúveis, nomeadamente B e C, são degradadas durante a esterilização resultando numa quantidade inferior destas no produto final. No entanto, após processamento, a concentração de nutrientes mantém-se estável durante o armazenamento enquanto produtos congelados e frescos apresentam taxas de perda superiores durante esse período (Rickman et al., 2007a). Algumas vitaminas também podem ser perdidas para o líquido utilizado na lata de conserva, mas podem manter-se estáveis nesse meio durante 1 a 2 anos, dependendo das condições de armazenamento. O nível de fibra, minerais, carotenoides, vitamina A e E mantêm-se semelhantes aos observados em alimentos frescos (Rickman et al., 2007b) enquanto os antioxidantes podem permanecer estáveis ou sofrer perdas consideráveis dependendo do tratamento térmico em questão (Dewanto, 2002; Hunter e Fletcher, 2002). A presença de minerais e a disponibilidade da fibra são altamente variáveis de acordo com o processamento (Rickman et al., 2007b).

3.3. Deterioração microbiológica

A deterioração dos alimentos pode ocorrer por diversas razões sejam essas químicas, físicas ou microbiológicas, mas têm em comum provocar alterações nas características dos alimentos de forma que estes deixem de ser seguros para o consumo humano. A deterioração microbiológica também apresenta um impacto noutros fatores tais como a perda do valor nutricional e no prazo de validade destes resultando assim também em perdas económicas e desperdício alimentar. Na área da produção de conservas a deterioração das mesmas pode ocorrer devido a diversos fatores tais como falhas no processo de fabrico tendo como exemplo falhas mecânicas ou de pessoas, falhas relacionadas com o processo como um processo térmico

impróprio e a formação de esporos resistentes ao calor ou falhas no recipiente através de uma desinfecção inadequada ou recipientes defeituosos (Kamboj et al. 2020). A deterioração microbiológica em conservas após um tratamento térmico inadequado pode ser detetada pelo aspeto do recipiente ou lata onde se encontram uma vez que em alguns casos microrganismos produzem gás devido a processos metabólicos levando a um aspeto "inchado" destas; porém, em certos casos tal não se verifica sendo necessário uma análise mais invasiva que requer a abertura da lata e a análise das suas características.

Contaminação microbiológica em conservas alimentares ocorre devido a diferentes tipos de microrganismos sendo os mais relevantes: mesófilos anaeróbios formadores de esporos, mesófilos aeróbios formadores de esporos, termófilos "flat sour" formadores de esporos, fungos resistentes ao calor, termófilos anaeróbios formadores de esporos não produtores de H₂S, termófilos anaeróbios formadores de esporos produtores de H₂S, anaeróbios do ácido butírico, formadores de esporos "flat sour" acidúricos.

Destes, entende-se por microrganismos mesófilos aqueles capazes de desenvolvimento à temperatura ambiente com uma temperatura ótima de 35°C numa gama cerca de 5 - 47°C e termófilos como aqueles capazes de crescer a temperaturas elevadas idealmente a 55°C numa gama de cerca 40 - 90°C (Erten et al., 2019; Jay et al., 2005a). Microrganismos aeróbios necessitam de oxigénio no meio para o seu desenvolvimento enquanto os anaeróbios não se desenvolvem na sua presença. Anaeróbios facultativos são capazes de proliferar em meios com oxigénio ou sem a presença deste e microaerofílicos necessitam de concentrações baixas de oxigénio no meio (Noor e khetarpal, 2019).

- **Mesófilos anaeróbios formadores de esporos:** pertencem maioritariamente ao género *Clostridium* no qual existem dois grupos, o grupo 1 que inclui estirpes proteolíticas de *C. botulinum*, *C. sporogenes* e anaeróbios de putrefacção resistentes ao calor e o grupo 2 constituído por estirpes não proteolíticas de *C. botulinum*, *C. perfringens* e anaeróbios do ácido butírico (Evancho et al., 2009). Este tipo de organismos são responsáveis por grande parte da degradação de conservas, principalmente o grupo 1 para alimentos com pH>4,5, devido a uma elevada resistência a temperaturas elevadas e ao facto do processo de produção de conservas proporcionar aos mesmos as condições ideais para o seu desenvolvimento (Evancho et al., 2009). Anaeróbios de putrefacção são responsáveis pela produção de gás que leva ao "inchaço" do recipiente juntamente com a degradação das características do produto (Parkinson et al., 2017). Anaeróbios do ácido butírico produzem ácido butírico, tais como *C. butyricum* e *C. pasteurianum*, juntamente com dióxido de carbono e hidrogénio levando também ao "inchaço" da conserva. São

capazes de se desenvolver em meios de pH 4,2 levando à sua presença tanto em alimentos ácidos como pouco ácidos (Landry et al., 2001).

- **Mesófilos aeróbios formadores de esporos:** pertencentes ao género *Bacillus* sendo que existem dois grupos, os microrganismos deterioradores de alimentos como *B. coagulans* e *B. stearothermophilus* e os que causam doenças ao ser humano como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* entre outros (Fritze e Claus, 2003). Geralmente não desenvolvem gás levando à aparência “plana” ou normal do recipiente com algumas exceções como *B. polymyxa*. Tratamento térmico tende a ser eficaz na eliminação deste tipo de organismos, mas células vegetativas podem fixar-se ao alimento durante a fase de embalagem da conserva resultando na produção de esporos (Oomes et al., 2007).
- **Fungos resistentes ao calor:** geralmente fungos apresentam uma sensibilidade alta a temperaturas elevadas tais como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* entre outros pelo que o tratamento térmico necessário para a sua inativação não é exigente e é altamente eficiente (Piecková et al., 2020). Porém, existem exceções em certos géneros como *Byssochlamys* (*B. fulva*, *B. nivea*), *Talaromyces* (*T. flavus*), *Eupenicillium* (*E. brefeldianum*) e *Neosartorya* (*N. fisheri*) que foram detetados em conservas à base de frutas e principalmente naquelas que estão em contacto com o solo. Tendem a provocar a descoloração do alimento e a alteração do odor (Piecková et al., 2020).
- **Termófilos “flat sour” formadores de esporos:** classe tipicamente associada a *Bacillus stearothermophilus*, uma bactéria termofílica e aeróbia que provoca a degradação de alimentos e o seu desenvolvimento provoca uma redução no pH dos alimentos juntamente com a ausência de “inchaço” em recipientes pelo qual a designação “flat sour”. Desenvolve-se a temperaturas elevadas numa gama de 40 - 75°C aproximadamente com uma temperatura ideal de 55°C e requer um pH acima de 5,3. Dadas as suas condições ideais de crescimento é altamente resistente a temperaturas elevadas tal como os seus esporos. Consegue deteriorar uma grande variedade de alimentos como carnes, vegetais e conservas à base de tomate. Os seus processos metabólicos levam à formação de ácidos sem a produção de gás alterando o sabor e aspeto do alimento, mas não apresenta consequências graves para a saúde humana (Evancho et al., 2009, Landry et al., 2001, Ababouch et al., 1999).
- **Termófilos anaeróbios formadores de esporos:** microrganismos nesta categoria distinguem-se pela sua capacidade de produzir ou não sulfureto de hidrogénio como produto secundário das suas vias metabólicas. Entre os termófilos não produtores de sulfureto de hidrogénio temos *T. thermosaccharolyticum*, um dos organismos mais significativos na degradação de conservas tais como vegetais. Produz elevadas quantidades de gases e ácidos tais como dióxido de carbono, hidrogénio, etanol, ácido

butírico, etanol e ácido láctico resultando no “inchaço” do recipiente. Os seus esporos são altamente resistentes a temperaturas elevadas (Evancho et al., 2009, Landry et al., 2001). Na classe dos produtores de sulfureto de hidrogénio *Desulfotomaculum nigrificans* é um dos microrganismos mais conhecidos pela degradação de alimentos à base de carne e vegetais. Apenas se desenvolve em alimentos com baixo teor de acidez com pH superior a 5,6. A sua presença em alimentos tende a causar uma cor escura nestes e um odor desagradável devido às reações desencadeadas pelo sulfureto de hidrogénio (Evancho et al., 2009, Landry et al., 2001).

- **Formadores de esporos “flat sour” acidúricos:** anaeróbios facultativos que não produzem gás mantendo a aparência do recipiente não alterada, mas causando a degradação do produto pela diminuição do seu pH e desenvolvimento de um sabor azedo. Um exemplo desta classe de organismos é *B. coagulans* associado a conservas ácidas como vegetais acidificados e produtos à base de tomate (Silva et al., 2013, Evancho et al., 2009).
- **Microrganismos não formadores de esporos:** classe constituída por bactérias gram-positivas (bactérias do ácido láctico), gram-negativas (*Enterobacter* e *Pseudomonas*), leveduras e fungos. Tendem a surgir por tratamento térmico insuficiente ou contaminação durante o processamento. Raramente surgem em conservas de baixo teor de acidez uma vez que o tratamento térmico é mais intenso quando comparados aos de baixa acidez (Evancho et al., 2009).

3.4. Controlo de qualidade e segurança alimentar

Apesar da enorme variedade de metodologias disponíveis para a preservação de alimentos, a sua utilização não é suficiente para garantir que o consumo desse alimento pela população seja seguro sobretudo numa época onde a quantidade e variedade de alimentos produzidos, comercializados e transportados apresenta um volume maior do que em qualquer outra época; este consumo está avaliado em 11,7 triliões de dólares americanos em 2019 com um aumento esperado de 5,0% por ano até 2027 (Grand View Research, 2020). O controlo da qualidade garante que aos alimentos sejam aplicadas as normas e legislações locais ou internacionais em vigor relativo às características que o produto deve possuir para ser comercializado de forma legal e segura. A segurança dos consumidores e a sua confiança na segurança e qualidade dos produtos que compram é um fator de extrema importância para o desenvolvimento social e económico tanto do setor alimentar como da economia global, levando ao aparecimento de uma cadeia de abastecimento alimentar global fortemente dependente dos

sistemas de produção, distribuição e regulação. Outro fator que impulsiona o aumento da importância do controle alimentar é o recente desenvolvimento de regiões outrora consideradas subdesenvolvidas permitindo que a população, até esse ponto limitada no acesso aos mercados internacionais ou nacionais, tenha acesso a novos produtos levando conseqüentemente a condições de vida superiores, o aumento populacional e a uma esperança de vida média superior reforçando progressivamente a necessidade de garantir a segurança alimentar.

O conceito de qualidade de um alimento consiste essencialmente nas características de um alimento que o tornam aceitável e adequado ao consumidor tais como a aparência, textura, sabor, valor nutricional e qualidade bacteriológica. Estas características são objetivas, tal como o valor nutricional ou a qualidade bacteriológica, que podem ser determinadas por análise química ou subjetivas tal como a aparência ou sabor (vaclavik et al., 2008). Para além disto, pode ainda ser definido como um conceito tridimensional dividido nas três categorias: procura, experiência e confiança (Darby et al., 1973). Por outro lado, segurança alimentar é um método utilizado para descrever a manipulação, preparação e armazenamento de alimentos de forma a evitar a sua contaminação e a transmissão de doenças provocadas pelos mesmos. Este método inclui as rotinas que devem ser realizadas para evitar possíveis riscos à saúde humana tais como a origem do alimento, práticas e legislação relativa à rotulagem, condições de higiene durante a manipulação, presença de aditivos alimentares, resíduos de pesticidas ou outros químicos, políticas em relação à biotecnologia e normas governamentais relativas à gestão das inspeções de importações e exportações e a sua certificação.

Um dos exemplos mais comuns de estratégias para atestar a segurança é a "Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo" (APPCC). Entende-se por "Ponto de Controlo Crítico" qualquer ponto na cadeia de produção onde uma falha nos procedimentos estabelecidos pode levar a danos nos consumidores e no próprio negócio, mas onde um controlo pode ser estabelecido para prevenir, eliminar ou reduzir o perigo até um patamar aceitável. Este protocolo evita a análise ao produto finalizado pois estabelece várias etapas de forma a evitar a contaminação desse ao longo da sua cadeia de produção, ou seja, em qualquer fase desde a produção até o embalamento e distribuição. Desta forma, os aspetos entre a indústria, mercado e consumidor são extensivamente regulados para o bem da saúde pública. Assim sendo, existe uma distinção entre o que se interpreta através de qualidade alimentar e segurança alimentar, mas ambos são aspetos críticos para qualquer meio onde se realize a gestão de recursos alimentares e existe um grau elevado de interdependência entre ambos.

A presença de contaminantes em alimentos refere-se à presença de microrganismos ou quaisquer químicos que desencadeiem o aparecimento de doenças em seres humanos podendo estas ser fatais pelo que a sua deteção, minimização e eliminação é uma das maiores prioridades para garantir a segurança alimentar. Segundo a Comissão Europeia, contaminantes em produtos

alimentares são substâncias que não foram intencionalmente adicionadas ao alimento que podem estar presentes como resultado das várias etapas de produção, empacotamento, transporte ou armazenamento ou através de contaminação pelo meio onde se encontram (Comissão Europeia). Contaminantes podem ser de origem antropogénica ou natural e geralmente separados em três categorias: físicos, químicos e biológicos (Moamen et al., 2020) com a existência de uma quarta categoria por vezes considerada, dependendo da literatura, a contaminação por alérgenos (CPD Online College, 2020). Começando pelos contaminantes físicos de natureza humana, aqueles que atualmente se destacam devido ao enorme volume da sua produção e à dependência atual que as atividades humanas apresentam nesses são os microplásticos tendo como exemplos poliéster, polietileno ou polipropileno (Thompson e Darwish, 2019) resultantes da degradação do plástico por reações químicas. Estas partículas são consumidas por animais marinhos que fazem parte da dieta humana resultando na acumulação destes compostos pelos consumidores. O mesmo efeito é observado para metais como mercúrio, chumbo arsénio (Thompson e Darwish, 2019; López et al., 2000). Contaminantes químicos apresentam um grande espetro de substâncias que afetam a saúde humana estando entre estes os agroquímicos como fertilizantes e pesticidas para proteger as colheitas (Polyxeni et al, 2016; Rather et al, 2017), antibióticos utilizados em gado para acelerar o seu desenvolvimento (Chattopadhyay, 2014), dioxinas relacionadas com cancro, diabetes e hipertensão (Muzembo et al., 2019), acrilamida, um carcinogénico resultante de tratamentos térmicos a produtos ricos em amido (Thompson e Darwish, 2019) e bifenilpoliclorados (Thompson e Darwish, 2019). Nesta categoria ainda se podem destacar outras substâncias nocivas tais como micotoxinas, toxinas de origem fúngica, sendo um exemplo os alcaloides de ergolina normalmente encontrados em cereais (Tittlemeier et al., 2019) cujo consumo pode levar a um conjunto de sintomas fatais designados ergotismo que podem levar a gangrena e perda de membros (Schardl, 2015). Atualmente é raro em humanos, com um número limitado de surtos em países em desenvolvimento, mas a utilização de cereais para a alimentação de gado ainda representa uma preocupação no controlo de qualidade (Stephanie et al., 2016) Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e 3-monocloropropano-1,2-diol formam-se com o processamento, especialmente térmico, de carne, leite e bebidas com potencial carcinogénico (Oranuba et al., 2019; Onami et al., 2015). Por fim, a contaminação biológica consiste na presença de organismos desde bactérias ou parasitas e também vírus. Estes apresentam alguns dos riscos mais sérios uma vez que doenças desencadeadas com estes geralmente apresentam consequências elevadas para a vida humana e animal. Alguns microrganismos de destaque nesta categoria incluem norovírus e o vírus da hepatite A, responsáveis por vómitos, diarreia, dor abdominal, febre e doença hepática crónica (Glass et al., 2009; Lindstrom e Korkeala, 2006). No caso das bactérias, as doenças podem ser causadas por infeção, intoxicação e infeção mediada por toxinas sendo algumas das espécies mais comuns na área alimentar a *Salmonella*, *Escherichia Coli*, *Listeria* e principalmente

Clostridium botulinum cujas toxinas provocam botulismo uma doença neuroparalítica potencialmente fatal (Lindstrom e Korkeala, 2006) pelo que o controlo da sua presença em alimentos é um dos aspetos mais regulados. Este controlo rigoroso é exacerbado pela capacidade destes organismos de adotar uma estrutura vegetativa altamente resistente ou produzir toxinas altamente resistentes a condições como temperaturas elevadas como as obtidas durante o processo de cozinhar um alimento. Apesar de menos comum, a zoonose, transmissão de agentes patógenos de uma espécie para o ser humano, pode ser observada com alguns microrganismos e parasitas como a *entamoeba*, *fascíola*, *Toxoplasma gondii* (Zolfaghari et al., 2018) e recentemente a transmissão de Coronavírus SARS-CoV-2 de morcegos para hospedeiros humanos.

4. Documentos Normativos

4.1. Normas ISO

A "Organização Internacional de Normalização" ou em inglês "*International Organization for Standardization*" (ISO) é uma organização mundial independente com o objetivo de desenvolver uma larga gama de padrões ou normas para produtos, materiais ou serviço e providenciar um conjunto de regras comuns a todos os seus estados-membros permitindo uma comercialização mais simples e aberta. As normas estabelecidas têm como objetivo garantir que quaisquer produtos alcancem os mercados ou consumidores com uma qualidade adequada (Investopedia, 2020). A verificação e validação de métodos para produtos alimentares, sejam estes qualitativos ou quantitativos, é regulada pela ISO 16140 com o nome "*Microbiology of the Food Chain*" sendo esta composta por 6 partes. A ISO 17468:2016 encontra-se relacionada com a validação de métodos no sentido em que estabelece os requerimentos e guias para a padronização de métodos de deteção (ISSO 17468:2016). Nesta situação, definem-se métodos de referência e métodos alternativos, segundo a ISO 16140-1:2016 parte 1, e estes são respetivamente os métodos internacionalmente reconhecidos e aplicados e métodos que detetam e quantificam o mesmo analito que o método de referência correspondente, mas ainda não foram validados. A parte 3 da ISO 16140-3:2021, intitulada "*Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory*", especifica o protocolo a utilizar para a verificação de métodos de referência e métodos alternativos validados para a determinação de microrganismos em produtos para consumo humano, animal, amostras ambientais nas áreas de produção alimentar e amostras das fases primárias de produção particularmente para casos de contaminação com bactérias e fungos. Segundo a ISO 16140-3:2016, a validação pode ser definida como "(...) o estabelecimento das características de um método e fornecimento de provas objetivas que os requisitos para uma determinada utilização são cumpridos" e a verificação corresponde "(...) à capacidade de um laboratório de utilizar um

método validado segundo as características definidas na sua validação para um dado propósito". Assim sendo, um laboratório pode selecionar uma metodologia onde o trabalho de validação já foi realizado, mas ainda deve efetuar trabalho experimental para verificar se apresenta as capacidades para o aplicar e se este apresenta os requisitos desejados (Eurachem, 2014; ISO 16140).

Existem parâmetros relacionados com a validação e verificação que é necessário contabilizar para a sua utilização correta em alimentos: o alcance do método (gama de produtos para os quais se afirma que o método é aplicável), alcance da validação (gama de produtos para os quais se afirma que o método está validado) e o alcance da aplicação laboratorial (gama de produtos onde o método é aplicado segundo o laboratório e se situam no alcance de validação). Estes são importantes para a distinção das fases de verificação de um método que são: verificação da implementação, representa a capacidade do laboratório de aplicar corretamente o método, e a verificação de itens que representa a capacidade do laboratório de testar alimentos que define como pertencendo ao alcance laboratorial.

Existem requerimentos para a implementação e verificação de métodos em relação à gama de produtos nos quais se pretende utilizar e assim sendo, existem 3 categorias, a "gama larga de alimentos", "gama limitada de alimentos" e a "larga gama de alimentos e outras categorias". Considerando que o objetivo pretendido no Estágio é a validação do método relativo à esterilidade em conservas será considerada uma gama limitada de alimentos pelo qual a variedade de amostras alimentares será limitada.

4.2. Legislação portuguesa

Na indústria alimentar destinada a conservas em Portugal, o processo de esterilização está regulado por uma multitude de normas em vigor, sendo as mais relevantes para o caso das conservas alimentares a NP-4404-1: 2002, referente ao controlo da estabilidade (entendendo-se por estabilidade a "capacidade de uma conserva ou um produto semelhante de manter as suas características após processamento nas condições normais de armazenamento, durante o período de validade e/ou nas condições de experimentação fixadas na respetiva norma") e a NP-2309-2: 1988 para a verificação da esterilidade. Ambas as normas descrevem processos destinados ao controlo da qualidade de lotes destinados a serem comercializados. Estes processos são realizados através da exposição das conservas a diferentes temperaturas durante um período de tempo definido e utilizando um meio de cultura adequado fornecendo assim a quaisquer microrganismos que tenham resistido ao processamento térmico as condições ideais para a sua proliferação.

4.3. Procedimento de Controlo de qualidade 33.12

Os procedimentos de controlos de qualidade são documentos que descrevem a forma através da qual os requisitos do sistema de gestão da qualidade são aplicados no laboratório. Tal como descrito na Norma ISO 9001: 2015, a adoção de um SGQ ajuda uma empresa a melhorar o seu desempenho global e proporciona a esta uma base sólida para um desenvolvimento sustentável (ISO 9001. (2015)). Assim sendo, um SGQ refere-se à atitude tomada pela empresa de forma a garantir que todos os processos exercidos são realizados com o máximo de eficiência permitindo organizar e melhorar a gestão e garantir a manutenção da qualidade do serviço satisfazendo as necessidades dos clientes (Azevedo, A. et al., 2011). É uma das principais formas de avaliação de uma empresa no mercado representando um fator importante na obtenção de creditações e a conformidade do SGQ com as normas internacionais em vigor confere a empresa uma qualidade mais elevada nos tipos de serviços prestados mais também uma relação de maior confiança entre si e os seus clientes (Machado S., 2012).

Para validação do método será utilizado o Processo de Controlo de Qualidade 33.12 (PCQ.33.12) intitulado “Validação do método em Análise Microbiológica” emitido a 11 de agosto de 2021. Este procedimento pretende definir as metodologias e ferramentas utilizadas na validação de métodos em análise microbiológica relativamente às fontes de incerteza, descrição da metodologia aplicada na estimativa das incertezas e na implementação de novos métodos. Este documento também estabelece os termos e definições utilizados pelo pessoal da empresa juntamente com as responsabilidades e funções dos mesmos. Para a validação/ verificação de novos métodos, o procedimento a adotar depende da matriz sendo que as três destacadas são águas, ar ambiente e alimentos/higio-sanitários pelo que nesta situação foi utilizado o procedimento relativo a alimentos.

5. Validação de métodos

5.1. Definições de validação e verificação

A utilização de métodos destinados a serem usados para análise química, tal como qualquer outro equipamento utilizado durante o procedimento requer uma avaliação para garantir que este está de acordo com as necessidades do laboratório. Esta avaliação é realizada através da validação do método, ou seja, o estudo das características deste e o estabelecimento de parâmetro mínimos a que este deverá corresponder para que a sua aplicação seja considerada

adequada. A definição do termo “validação” está sujeito a diferentes interpretações e significados uma vez que está sujeito às normas e legislações de cada país e às respectivas diferenças nos seus guias para a aplicação de várias metodologias. A situação melhorou com o estabelecimento do VIM (“Vocabulário Internacional de Metrologia”), um documento normativo que visa a criação de uma terminologia de metrologia mais harmonizada entre laboratórios acreditados pela ISO 1589 e ISO/IEC 17025, mas ainda assim a terminologia relativa a validação de métodos ainda está longe de ser uniforme. Assim sendo, a validação de um método consiste essencialmente em definir o processo através do qual o método é realizado, os seus requisitos analíticos e a confirmação que este tem capacidades consistentes com o que está compreendido para a sua aplicação. De forma a demonstrar as diferentes formas pelas quais a validação pode ser interpretada são apresentadas as definições para a ISO 9000, ISO/IEC 17025 e a 3.º edição do VIM de 2012 (Tabela 2):

Tabela 2: Definição do conceito de “validação” segundo a ISO 9000:2005, ISO/IEC 17025:2005 e VIM (Eder e Hosnedl, 2005; ISO/ IEC 17025:2005).

ISO 9000:2005	Confirmação, através do fornecimento de evidência objetiva, que os requisitos para um uso ou aplicação específica foram cumpridos.
ISO/IEC 17025:2005	Confirmação através da análise e fornecimento de evidência que os requisitos particulares para um uso específico foram cumpridos.
VIM	Verificação onde os requisitos específicos são adequados para o uso pretendido.

A validação de um método encontra-se fortemente associada ao seu desenvolvimento uma vez que muitas das características de desempenho são observadas quer durante o desenvolvimento do método, quer durante a validação. Porém, a validação do método deve ser sempre realizada quando este alcança a sua versão final.

Um laboratório pode adotar um método já validado, ou seja, o trabalho para a avaliação do seu desempenho já foi realizado; no entanto, o laboratório ainda deve confirmar a sua capacidade de aplicar esse método. Este é o conceito designado por “**verificação**” definido pela ISO 9000:2005 (Eder e Hosnedl, 2005) como “(...) *confirmação, pelo fornecimento de evidência objetiva, que requisitos específicos foram preenchidos*” ou pela VIM (BIPM) como “(...) *fornecimento de evidência objetiva que confirma que um dado item preenche os requisitos específicos*”. Assim sendo, na verificação o laboratório desempenha trabalho laboratorial de forma a confirmar se o método apresenta as características desejáveis, mas este será, em princípio, um trabalho mais leve quando comparado com o que seria necessário para a validação de um método desenvolvido na própria empresa. Em algumas situações conceitos como validação primária e secundária podem ser utilizadas sendo esta última equivalente à verificação.

5.2. Importância da validação de um método

O desenvolvimento de métodos para fins analíticos representa um dos aspetos mais importantes para o desempenho de qualquer laboratório no estudo de diferentes tipos de materiais sejam estes para avaliação de bens para comércio, composição de materiais destinados a construção, análise de fluídos por razões médicas ou criminais, entre outros.

Na análise de produtos alimentares para o consumo do público, a quantidade de aspetos a ter em conta considerando a diversidade de organismos, as suas variadas condições ideais de desenvolvimento e nova legislação ou edições que possa entrar em vigor devido a novos perigos ou para um controlo mais exigente requer uma grande variedade de métodos ou a utilização destes de formas não inicialmente pretendidas. É necessário também ter em conta a viabilidade destes mesmos métodos devido aos custos que possam surgir tanto da análise ou de compensações devido à falta de qualidade da mesma pelo que os resultados obtidos devem apresentar a maior credibilidade possível. Desta forma, surge a necessidade de definir quando é que um método deve ser validado e neste sentido, a ISO/IEC 17025:2005 apresenta um conjunto de situações incluindo: a utilização de métodos não acreditados, métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório, a utilização de métodos acreditados fora do seu uso pretendido (diferentes amostras/ matrizes, material com diferentes características, etc...) e amplificação ou modificação de métodos padronizados. Adicionalmente, a validação também é necessária para que o método seja aceite por agências internacionais e é um requisito para a acreditação segundo a ISO/IEC 17025:2005.

Após o desenvolvimento do método existem duas vias através das quais o método pode ser validado: a **comparação interlaboratorial** e a **via intralaboratorial**. Relativamente à primeira opção pode ser utilizada se um método se destina a ter uma larga gama de aplicações sendo por isso o estudo colaborativo entre vários laboratórios a abordagem mais prática e com apresentação de resultados robustos. Se o método foi desenvolvido por um laboratório para uso próprio devido a competição ou falta de interesse no mesmo, uma abordagem intralaboratorial é a mais adequada; no entanto, o processo será concluído com a realização de um ensaio interlaboratorial para comparação de resultados.

5.3. Parâmetros de validação

A necessidade dos laboratórios de utilizar métodos validados é agora universalmente aceite como um requisito na maioria dos setores de análise. Desta forma, para iniciar o processo

de validação o laboratório deve primeiro discutir os critérios a considerar para avaliar o método e tal é registado num **plano de validação** que contém informação como: **título** (descrição método, quem o realiza e quando, matrizes, etc...), **planeamento** (objetivo do método, características que serão investigadas), **características de desempenho** e um **sumário** de todo o processo. As características de desempenho ou parâmetros de validação serão as mais importantes para definir se a credibilidade do método pode ser estabelecida ou não. Estas são variadas e tentativas de harmonização por parte do “Conselho Internacional para Harmonização dos Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano” foram realizadas (ICH); no entanto, nem todas são testadas para um dado método dependendo disso da sua aplicação. Alguns dos parâmetros mais relevantes estabelecidos pela ICH incluem especificidade, repetibilidade, reprodutibilidade, linearidade, os limites de deteção e quantificação, exatidão e precisão.

Inicialmente era pretendida a validação do método através da ISO-16140-3, porém a metodologia aplicada para validação foi realizada segundo a PCQ.33.12, um documento normativo interno da empresa, utilizado para a validação de métodos em análise microbiológica. Para este procedimento foram realizadas 30 amostras dos quais pelo menos 10 devem ser positivos e no mínimo 2 brancos. Com esta informação e para a posterior validação do método são calculadas características de desempenho como sensibilidade, eficiência, especificidade, seletividade e a taxa de falsos positivos e negativos (Silliker, 2020). Esta avaliação é realizada segundo a seguinte Tabela:

Tabela 3: Parâmetros de validação microbiológica qualitativa (Silliker, 2020).

		Presuntivos		
		+	-	
Confirmados/ Verdadeiramente	+	a (verdadeiros positivos)	b (falsos negativos)	a+b
	-	c (falsos positivos)	d (verdadeiros negativos)	c+d
		a+c	b+d	n (número de testes)

Assim sendo, os cálculos para as diferentes características de desempenho foram os seguintes:

$$Eficiência = \frac{a+d}{n} \quad \text{(Equação 1)}$$

A eficiência corresponde à fração de colónias/ensaios totais corretamente atribuídos na contagem presuntiva. Ou seja, corresponde à soma de amostras cujo resultado foi corretamente

observado, ou seja, se a amostra está contaminada e ocorre de facto crescimento nos meios de cultura ou se esta não se encontra contaminada pelo que crescimento não foi observado dividindo pelo número total de ensaios segundo a equação 1 (Silliker, 2020).

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{c+d} \quad \text{(Equação 2)}$$

A especificidade corresponde à fração de resultados negativos corretamente atribuídos na contagem presuntiva. Assim sendo, corresponde ao número de colónias ou ensaios não presuntivos verdadeiros pela divisão da soma do número de colónias ou ensaios não presuntivos verdadeiros com o número de colónias ou ensaios presuntivos, mas que são falsos, pela equação 2 (Silliker, 2020). Resultados deste parâmetro geralmente encontram-se acima de 80%.

$$\text{Taxa de falsos negativos} = \frac{b}{b+d} \quad \text{(Equação 3)}$$

A taxa de falsos negativos é a fração de resultados negativos (por exemplo: colónias atípicas) que demonstram ser colónias alvo, ou seja, é o número de colónias ou ensaios não considerados presuntivos, mas que são verdadeiros pela divisão da soma do número de colónias ou ensaios não considerados presuntivos, mas que são verdadeiros com a soma do número de colónias ou ensaios não presuntivos verdadeiros segundo a equação 3 (Silliker, 2020).

$$\text{Taxa de falsos positivos} = \frac{c}{a+c} \quad \text{(Equação 4)}$$

A taxa de falsos positivos é a fração de resultados positivos (por exemplo: colónias típicas) que demonstram ser devido a organismos não-alvo, isto é, é o número de colónias ou ensaios presuntivos, mas que são falsos pela divisão da soma do número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros com a soma do número de colónias ou ensaios presuntivos, mas que são falsos segundo a equação 4 (Silliker, 2020).

$$\text{Seletividade} = \frac{a}{n} \quad \text{(Equação 5)}$$

A seletividade é o rácio do número de colónias/ensaios-alvo com o número total de colónias (não válidos se seletividade for < 10 %), ou seja, a divisão do número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros pelo número total de colónias ou ensaios segundo a equação 5 (Silliker, 2020).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a+b} \quad \text{(Equação 6)}$$

A sensibilidade é a capacidade do método em detetar o organismo-alvo, a fração do total de positivos, corretamente atribuídos na contagem presuntiva (com valores geralmente superiores a 90 %), isto é, o número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros pela divisão da soma do número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros com o número de colónias ou ensaios não considerados presuntivos, mas que são verdadeiros segundo a equação 6 (Silliker, 2020).

6. Caracterização dos organismos de referência

Tal como referido anteriormente a validação da metodologia atual associada à deteção de organismos patogénico para controlo de qualidade dos lotes produzidos em conservas alimentares é predominantemente realizado segundo os parâmetros referidos na NP-2309-3 submetendo amostras retiradas desses mesmos lotes a temperaturas distintas de forma a avaliar o crescimento de organismos que tenham resistido ao processo de esterilização. Em condições normais laboratoriais os lotes entregues por clientes são submetidos a este processo conferindo um resultado final positivo ou relativo que confirma se estes são seguros para consumo humano. Nesta situação, a validação foi realizada através da contaminação e incubação de amostras fornecidas sendo que essas mesmas amostras foram, após o período de incubação, analisadas segundo a norma.

Para tal, os organismos utilizados como indicadores para este processo foram *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Zygosaccharomyces rouxii* e *Escherichia coli*. Todos estes organismos apresentam comportamentos, condições e características bem estudadas tornando-os modelos ideais para a deteção de contaminações.

- ***Bacillus cereus***: bactéria frequentemente associada a contaminações alimentares pelo que a sua deteção é fundamental. Espécie gram-positiva, com forma do bacilo, móvel, anaeróbia facultativa e formadora de esporos (Paul Sulav et al., 2021). Estes esporos são altamente resistentes a temperaturas elevadas ao contrário das células vegetativas. Capaz de proliferar em temperaturas entre 4 e 50°C com uma temperatura ideal entre os 30 - 50°C. A gama de pH que permite desenvolvimento situa-se nos 4,9 e 9,3 com um pH ideal entre 6,0 - 7,0 e 2,0 - 11,0 para as toxinas respetivamente (ASAE). Contaminação resulta em sintomas tais como náusea, vómitos e diarreia, mas não é considerado fatal (katelijne Dierick et al., 2005; Helmutt Mahler et al., 1997). Encontra-se distribuído largamente na natureza em água, solo, matéria em decomposição e outros pelo que é encontrado numa grande variedade de produtos alimentares frescos de origem animal e hortícola. É capaz de produzir toxinas (produção relativamente baixa em condições de anaerobiose) pelo que medidas de controlo são necessárias para prevenir o seu crescimento.

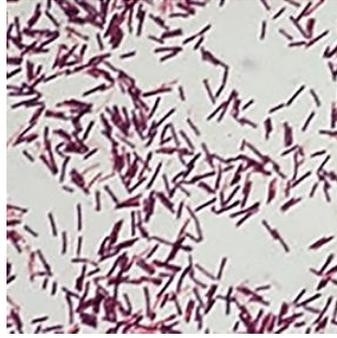


Figura 8: Coloração de Gram em *Bacillus cereus* (Food safety Council).

- ***Clostridium perfringens*:** bactéria gram-positiva com forma de bacilo e anaeróbia estrita (Kiu et al., 2018). Cresce em temperaturas na gama dos 12 - 50°C com uma temperatura ótima no intervalo de 43 - 47°C, produzindo enterotoxina entre 43 e 47°C, e apresenta um pH ideal entre 6.0 e 7.0, com um mínimo de 5.0 para proliferar, e forma esporos entre 6.0 e 8.0 (ASAE). Espécie sensível a temperaturas elevadas ao contrário dos esporos que são altamente resistentes. Amplamente distribuído no ambiente incluindo a flora intestinal do Homem. Encontrado numa grande variedade de alimentos principalmente aqueles ricos em proteína animal como carnes, leite ou molhos.

Clostridium perfringens produz enterotoxina tipo A que interfere nos processos de transporte de água, sódios e cloreto através da mucosa intestinal resultando em sintomas tais como dores abdominais agudas, febre, diarreia, náusea e vômitos. Estes surgem após consumo de alimentos contaminados com um elevado número de células vegetativas ($>10^6$ células vegetativas por grama de alimento) geralmente considerada uma contaminação não grave sendo raramente fatal através de desidratação do indivíduo ou outras complicações. Sintomas mais severos podem ser gangrena de gás também chamada mionecrose clostrídica devido predominantemente à produção de α -toxina e gás proveniente do processo metabólico da bactéria que leva à necrose dos tecidos e potencial morte (ASAE).

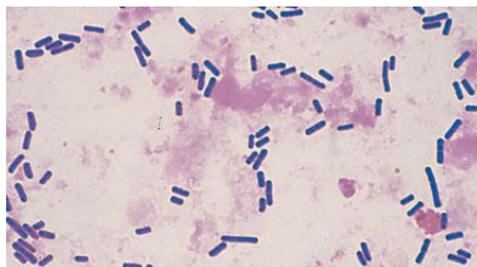


Figura 9: Coloração de Gram em *Clostridium perfringens* (Grupo EP).

- ***Limosilactobacillus fermentum***: bactéria gram-positiva pertencente à família das bactérias ácido-láticas, forma de bacilo e anaeróbia facultativa. Apresenta crescimento ideal em meios de pH entre 5,0 e 7,0 (Rault, Aline et al., 2009; Melo, Tauá Alves, et al. 2017;) e resistência elevada a temperaturas altas em certos meios como molho de tomate devido à composição (Zheng et al., 2020; Juven et al., 1983) É um organismo presente no sistema gastrointestinal humano e de outros mamíferos apesar de não ser considerado uma espécie comum (Duar, Rebbeca M., et al., 2017). Considerado um probiótico e seguro para consumo devido a sua não patogenicidade, presença natural no organismo humano e resistência às condições intestinais.



Figura 10: Coloração de Gram para *Limosilactobacillus fermentum* (Ionut et al. 2019).

- ***Zygosaccharomyces rouxii***: levedura frequentemente utilizada em processos de fermentação tais como no molho de soja e miso (Kobayashi M. et al. 1998). Gama ótima de pH entre 3,5 e 5,5 com um mínimo e máximo respectivos para crescimento de 1,5 e 10,5 e temperatura ótima de 28°C (Restaino, L., et al. 1983). É um organismo conhecido pela sua capacidade de degradação de alimentos na indústria alimentar devido a sua capacidade de proliferar em meios altamente salinos e xerotolerância isto é, esta espécie é capaz de crescer em meios com atividade da água extremamente baixa quando comparada a outras leveduras podendo então proliferar em meios ricos em açúcares como mel ou compotas (Martorell, Patricia, et al. 2007). É capaz de crescer numa larga gama de pH e temperaturas variadas dependendo da concentração de açúcares no meio (Membré et al., 1999)

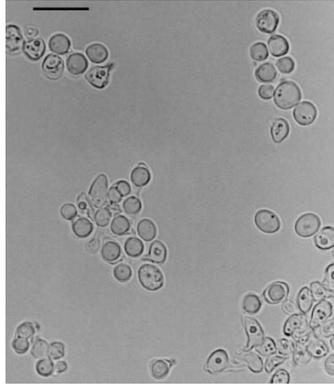


Figura 11: Imagem microscópica de *Zygosaccharomyces rouxii* (Kurtzman et al., 2011).

- ***Escherichia coli*:** bactéria gram-negativa com forma de bastonete e anaeróbia facultativa. Apresenta crescimento numa gama de temperaturas entre os 7 e 46°C com uma temperatura ótima de crescimento entre 35 e 40°C (ASAE) e um pH ótimo de 6,5 a 7,5 (Philip, P., et al., 2018). *E. coli* é geralmente encontrado no trato intestinal de humanos e outros animais de sangue quente sendo que grande parte das estirpes observadas são benéficas para o hospedeiro. Porém, algumas são responsáveis pela contaminação de alimentos e conseqüente intoxicação alimentar. O método de transmissão mais comum para este organismo é o contacto com matéria fecal seja este por contacto fecal-oral durante a criação de animais, contaminação de terras por contacto com excrementos animais, contaminação de carcaças por manuseamento errado durante o abate e evisceração e outros. Alguns dos alimentos mais comuns onde *E. coli* pode ser encontrada incluem carnes, leites, produtos vegetais e água. Infecções por *E. coli* desencadeiam sintomas tais como diarreia, dores abdominais, febre e vômitos podendo estes ser fatais, dependendo do tipo de *E. coli* responsável, pela possibilidade de insuficiência renal ou pressão sanguínea elevada (ASAE).

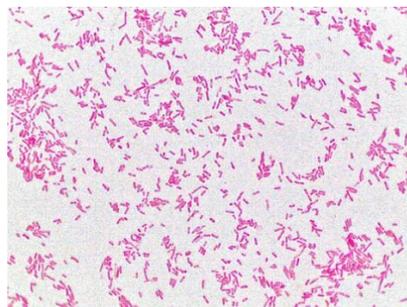


Figura 12: Coloração de Gram de *Escherichia Coli*.

7. Materiais e métodos

O trabalho desenvolvido durante o estágio na Silliker Portugal S.A baseou-se predominantemente na norma portuguesa NP-2309-2 (Prova de esterilidade) com certas etapas e referências pertencentes à NP-4044-1 (prova de esterilidade). Devido às normas estabelecidas pela empresa detalhes tais como informação relativa aos clientes não poder ser fornecida pelo que o referido é apenas o essencial para a interpretação dos resultados observados.

7.1. Amostragem

As amostras utilizadas neste trabalho foram analisadas no laboratório de microbiologia da Silliker Portugal, S. A. Para a validação do método de esterilidade foram utilizados um total de 40 amostras através das quais foram realizados 66 ensaios com as diferentes matrizes de conservas sendo que estes ensaios representam amostras contaminadas artificialmente por diferentes microrganismos e amostras não contaminadas para efeito de comparação. Esta contaminação foi realizada através de amostras padrão de controlo diário do processo (DPCS) que são uma matriz alimentar estéril inoculada com uma concentração baixa do organismo alvo com o objetivo de assegurar a validade do procedimento e confirmar que os procedimentos laboratoriais estão sob controlo ao serem analisados da mesma forma e segundo as especificações das amostras fornecidas por clientes. Desta forma, o laboratório prova que consegue detetar o organismo alvo com elevada capacidade e execução correta dos métodos analíticos. Para a realização do trabalho foram utilizados DPCS disponíveis em laboratório com as seguintes culturas: *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Limosilactobacillus fermentum* e *Zygosaccharomyces rouxii*.



Figura 13: DPCS de vários microrganismos.

Para contaminação das amostras removeram-se porções da matriz alimentar que foram colocadas em frascos selados com parafina para simular as condições de anaerobiose encontradas numa conserva.

Na Tabela 4 estão generalizadas as amostras analisadas ao longo do trabalho e a categoria à qual pertencem segundo a ISO 16140-3: 2021:

Tabela 4: Classificação das diferentes conservas alimentares analisadas segundo o estabelecido pela ISO-16140.

Produto	N. ° de amostras
Produtos à base de peixe prontos a consumir ou aquecer	18
Frutas e vegetais processados	17
Produtos de carne prontos a consumir ou aquecer	2
Produtos de aves prontos a consumir ou aquecer	2
Alimentos com múltiplos componentes ou componentes alimentares	1

Na Tabela 5 estão registadas as amostras utilizadas para a validação do método estando estas registadas segundo o número da amostra e respetivo ensaio

Tabela 5: Conservas analisadas durante o estágio com o respetivo número, ensaios realizados, o tipo de produto e organismo utilizado para a contaminação.

Número da amostra	Ensaio	Produto	Contaminação
1	1	Atum em azeite	<i>B. cereus</i>
2	2	Atum em azeite	<i>B. cereus, C. perfringens</i>
3	3	Atum em azeite	<i>C. perfringens</i>
4	4	Cavala grelhada natural	<i>C. perfringens</i>
	5		<i>C. perfringens</i>
5	6	Cavala grelhada natural	<i>C. perfringens</i>
	7		<i>C. perfringens</i>
6	8	Cavala grelhada em azeite	<i>C. perfringens</i>
	9		<i>C. perfringens</i>
7	10	Molho de tomate	-
	11		
8	12	Cogumelos enlatados	<i>L. fermentum</i>
	13		
9	14	Cogumelos enlatados	<i>B. cereus</i>
	15		

10	16	Cogumelos enlatados	<i>L. fermentum, B. cereus</i>
	17		
11	18	Tremoços em conserva	-
12	19	Sardinha em tomate picante	-
	20		
13	21	Feijão Branco	-
	22		
14	23	Sardinha em azeite	-
	24		
15	25	Atum em conserva natural	-
	26		
16	27	Atum em conserva natural	-
	28		
17	29	Sardinha em molho de tomate	-
18	30	Tremoços em conserva	-
	31		
19	32	Sardinha em azeite	<i>C. perfringens</i>
	33		
20	34	Salsicha de aves	<i>C. perfringens</i>
	35		
21	36	Feijoada transmontana	<i>C. perfringens</i>
	37		
22	38	Polpa de tomate	-
23	39	Polpa de tomate	-
24	40	Polpa de tomate	-
25	41	Pêssego em calda	<i>L. fermentum</i>
	42		
26	43	Ananás em calda	<i>L. fermentum</i>
	44		
27	45	Tomate pelado	<i>L. fermentum</i>
	46		
28	47	Salsicha de aves	<i>E. coli</i>
	48		
29	49	Salada de fruta	<i>Z. rouxii, B. cereus</i>
	50		
30	51	Feijão preto	<i>Z. rouxii, B. cereus</i>
	52		
31	53	sardinha em azeite	<i>C. perfringens</i>
32	54	Patê de sardinha	<i>C. perfringens</i>
33	55	Sardinha em água	<i>C. perfringens</i>
	56		<i>C. perfringens</i>
34	57	Tomate pelado	<i>L. fermentum</i>

	58		
35	59	Polpa de maracujá	<i>L. fermentum</i>
	60		
36	61	Feijoada transmontana	<i>B. cereus, E. coli</i>
	62		
37	63	Sardinha em azeite	-
38	64	Feijão preto	<i>B. cereus, E. coli</i>
39	65	Sardinha em azeite	<i>B. cereus, E. coli</i>
40	66	Patê de atum	<i>B. cereus, E. coli</i>

7.2. Prova de estabilidade

A avaliação da esterilidade em conservas é realizada segundo a norma 2309-2:1988 consistindo esta na pesquisa de microrganismos que possam estar presentes na amostra. Para este efeito foram preparadas sementeiras com porções das amostras em diferentes meios de cultura. Os parâmetros iniciais para a avaliação da esterilidade encontram-se definidos na NP-4404-1 sendo conservas definidas como "Género alimentício ou alimento para animais que sofreu um tratamento térmico ou outro, capaz de reduzir a flora microbiana a um pequeno número de esporos quiescentes de microrganismos não patogénicos e não toxigenicos, (...)". Esta norma é relativa ao processo de avaliação da esterilidade das conservas.

Conservas alimentares encontram-se separadas em duas classes, produtos de **categoria 1** ou seja aqueles com $\text{pH} \geq 4,5$ juntamente com tomate inteiro ou em pedaços, produtos acidificados e adicionados de amido e produtos de **categoria 2** com $\text{pH} < 4,5$. Embalagens também são separadas segundo o material do qual estas são fabricados sendo que existem: embalagens metálicas rígidas, embalagens de vidro, embalagens plástica, metaloplásticas e cartão metal plástico. Embalagens metálicas rígidas podem ser avaliadas segundo as deformações que surgem durante o período de incubação destas, assim sendo podem ser divididas em; embalagem normal (sem deformações observadas), embalagem frouxa (leve dilatação da lata), embalagem opada (dilatação facilmente observada devido à produção de gases por parte dos microrganismos) e embalagem com fugas (observação de derrames do conteúdo)

A prova de estabilidade compõe juntamente com a prova de esterilidade o processo para a análise de conservas alimentares pelo que são realizadas em conjunto e a parte inicial desta norma é necessária para prosseguir para aprova de esterilidade. Assim sendo, a prova de estabilidade requer 3 unidades não defeituosas de um dado lote. Estas são submetidas a uma

análise externa ao recipiente para verificar se alguma anomalia é detetada. Caso nada seja observado procede-se à prova de estufa às seguintes temperaturas: que são incubadas a $\leq 25^{\circ}\text{C}$ (temperatura ambiente), outra a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a última a $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias. As latas são colocadas sob um papel unicolor absorvente e retiradas frequentemente para verificar se surgiram defeitos. Após o período de incubação, as latas são colocadas à temperatura ambiente para equilibrar a temperatura entre as três. De seguida, são realizados **exames ao exterior da embalagem** (verificar se as embalagens estão normais, frouxas, opadas ou com fugas), **exame ao conteúdo** (verificação das características organoléticas como aspeto, textura, cor e odor), a **medição do pH** caso alterações físicas tenham sido observadas e o **exame microscópico** aplica-se caso ocorram alterações consideráveis no aspeto ou cheiro do produto, diferenças de $\text{pH} > 0,3$ e $< 0,5$ (se maior que 0,5 então é considerado não estável) e para produtos com peso líquido acima de 1,5 kg.



Figura 14: Medição do pH para a amostra 34 após incubação a 37°C e 55°C respetivamente.

7.3. Prova de esterilidade

A norma 2309-2: 1988 indica o procedimento a utilizar para determinar a esterilidade das conservas alimentares através da realização de sementeiras. Neste caso, para validação do método através da observação de desenvolvimento bacteriano, foram preparadas amostras de diversas matrizes alimentares onde se procedeu à sua contaminação por diversos microrganismos através de DPCS preparados no laboratório. Essas passam então por um período de incubação de uma semana às temperaturas de 37°C e 55°C , tal como referido na norma 4404-1, para a pesquisa de populações microbianas mesófilas e termófilas.

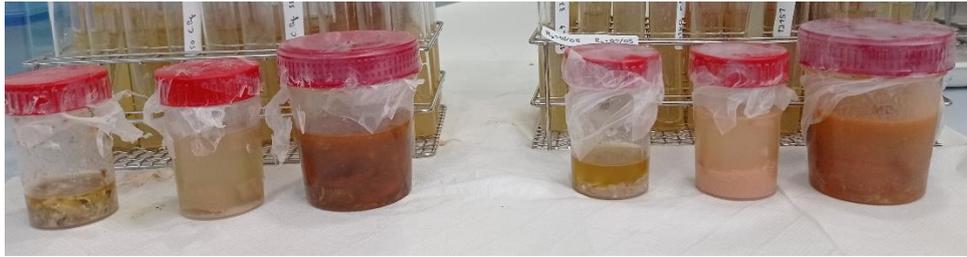


Figura 15: Amostras 19,20 e 21 após incubação a 55 °C e 37 °C respetivamente.

Condições de assepsia são fundamentais para amostras não contaminadas de forma a prevenir a contaminação destas. Para tal, é necessário passar por álcool e flamejar a embalagem antes de proceder à sua abertura.

A execução da norma define duas técnicas distintas de acordo ao pH da matriz a utilizada estando então separada pelos alimentos de pH inferior a 4,5 e aqueles com um pH superior ou igual a 4,5.

7.3.1. Conservas de pH \geq 4,5

A partir das amostras incubadas a 37 e 55°C são preparadas sementeiras nos seguintes meios:

- 1.** Meio de dextrose triptose amido (DTA) - Semearam-se 3 tubos com 2 gramas ou 2 cm³ de inóculo;
- 2.** Tioglicolato - Semearam-se 3 tubos com 2 gramas ou 2 cm³ de inóculo;
- 3.** Meio de ágar dextrose triptose (ADT) - Semearam-se em superfície 3 tubos com 0,2 gramas ou 0,2 cm³ de inóculo com uma ansa ou pipeta de Pasteur fechada, esgotando ao longo da superfície do meio de cultura;
- 4.** Meio de extrato de carne elevedura (ECL) - Semearam-se em profundidade 3 tubos com 0,2 gramas ou 0,2 cm³ de inóculo colhido com ansa ou pipeta de Pasteur fechada, esgotando por movimento de espiral ao longo do meio de cultura;
- 5.** Meio de peptona de soja e amido (PSA) - Utilizado apenas para conservas vegetais. Semearam-se em profundidade 3 tubos com 0,2 gramas ou 0,2 cm³ de inóculo colhido com ansa ou pipeta de Pasteur fechada, esgotando por movimento de espiral ao longo do meio de cultura, regenerado e arrefecido a cerca de 45°C.

As sementeiras são incubadas durante 6 dias sendo que após 3 dias de incubação procedeu-se à realização de uma repicagem dos meios líquidos já incubados (tioglicolato e DTA) para novos meios sólidos (ADT e ECL) que são colocados à mesma temperatura:

6. Repicagem do meio DTA para ADT - Semearam-se em superfície 3 tubos de ADT;
7. Repicagem do meio tioglicolato para ADT - Semearam-se em superfície 3 tubos de ADT;
8. Repicagem do meio tioglicolato para ECL - Semearam-se em profundidade 3 tubos de ECL.

O mesmo processo é realizado para as amostras a 37 e 55°C.

7.3.2. Conservas de pH < 4,5

A partir das amostras incubadas são preparadas sementeiras com um procedimento igual ao descrito de para pH $\geq 4,5$, mas com a adição de outros meios. Para as amostras incubadas a 37°C são também realizadas sementeiras em:

1. Meio líquido de Man, Rogosa e Sharpe - Semearam-se 3 tubos com 2 gramas ou 2 cm³ de inóculo;
2. Meio sólido de Man, Rogosa e Sharpe - Semearam-se em profundidade 3 tubos com 0,2 gramas ou 0,2 cm³ de inóculo colhido com ansa ou pipeta de Pasteur fechada, esgotando por movimento de espiral ao longo do meio de cultura mantido em sobrefusão;
3. Meio de Cooke Rose Bengal suplementado com cloranfenicol - Semearam-se à superfície 5 placas de *Petri* com 0,2 gramas ou 0,2 cm³ de inóculo;
4. Meio para *Bacillus thermoacidurans* - Utilizado exclusivamente para conservas à base de tomate. Semearam-se por incorporação 3 placas de *Petri* com 2 gramas ou 2 cm³ de inóculo.

A incubação é realizada durante 3 dias a 37°C para o meio MRS (sólido e líquido), o meio Cooke Rose Bengal durante 5 dias a 25 ± 2°C e o meio para *Bacillus thermoacidurans* durante 5 dias a 45 ± 1°C. Para as amostras incubadas a 55°C realizam-se apenas as sementeiras referidas nas amostras de pH <4,5, que são incubadas a 55°C durante 6 dias, e o meio *B. thermoacidurans* incubado a 4 °C durante 3 dias. Após 3 dias de incubação procedeu-se à repicagem repicando o meio DTA para meio ADT, meio Tioglicolato para ADT e ECL e do meio MRS líquido para meio MRS sólido incubado estes novamente durante 3 dias.

5. Repicagem do meio MRS para meio MRS agar - Semearam-se 3 tubos em profundidade no meio MRS agar mantido em sobrefusão a 46.°C

A leitura dos resultados é realizada segundo o estabelecido pela norma e assim sendo, considera-se uma:

- **Conserva estéril:** não apresenta desenvolvimento microbiano em todos os meios de cultura após provas de estufa negativas, ou seja, não ocorreu alteração no aspeto da conserva;
- **Conserva comercialmente estéril e microbiologicamente estável:** desenvolvimento microbiano proveniente da presença de raros esporos de *Bacillaceae*, sendo que os meios líquidos revelam cultura, podendo os sólidos de primo-cultura, nunca mais de 1 tubo em cada 3 apresentar menos de 10 colónias isoladas, após provas de estufa negativas. Diferencia-se da conserva estéril uma vez que desenvolvimento bacteriano limitado, mas ainda comercialmente permitido é observado;
- **Conserva não estéril e microbiologicamente instável:** desenvolvimento microbiano seguramente proveniente da conserva, mas que não satisfaça as condições mencionadas na conserva comercialmente estéril, neste caso, a série de líquidos e sólidos apresentam cultura de idênticas características, após provas de estufa positiva ou negativas;
- **Conserva não estéril e microbiologicamente instável:** ausência de desenvolvimento microbiano em todos os meios de cultura, mas verificando-se no exame microscópico e/ou em outros ensaios, como o pH, caracteres organoléticos e comportamento da embalagem, alterações resultantes de anterior desenvolvimento microbiano no produto, seguido do fenómeno denominado de autoesterilização;
- **Conserva estéril, mas não estável:** ausência de desenvolvimento microbiano em todos os meios de cultura, exame microscópico normal após provas de estufa positivas, ou seja, ocorreram alterações no aspeto da conserva tais como inchaço.

7.4. Preparação e composição dos meios de cultura

Os seguintes meios de cultura foram utilizados neste trabalho: meio Tioglicolato, meio DTA, meio ADT, meio ECL, meio sólido MRS, meio líquido MRS, meio Cooke Rose Bengal e meio para *Bacillus thermoacidurans*. Apesar de indicado na norma como sendo utilizado para conservas vegetais meio PSA não foi empregado no decorrer do estágio.

7.4.1. Meio de cultura de tioglicolato

O meio de cultura tioglicolato já preparado da Biokar, para um volume de 1000 ml, é composto por: 5 gramas de extrato de levedura, 15 gramas de triptona, 5,5 gramas de dextrose (D-glucose), 0,5 gramas de tioglicolato de sódio, 2,5 gramas de cloreto de sódio, 0,5 gramas de L-cisteína, 0,001 gramas de resazurina e 0,75 gramas de agar. O meio é adicionado ao respetivo

volume de água e colocado numa placa de agitação e aquecimento com um magnete até se obter homogeneidade. Este é então distribuído por tubos num volume de 10 ml que são colocados num autoclave a 121°C durante 15 minutos. Este meio é utilizado para testar a aerotolerância de microrganismos que pode ser observada pela sua posição no meio.

7.4.2. Meio de cultura caldo dextrose triptose amido (DTA)

A constituição do meio DTA, para um volume de 1000 ml de água desionizada, é a seguinte: 3 gramas de extrato de carne (Biokar), 10 gramas de triptose (peptona tríptica de carne) (Merck), 5 gramas de dextrose (D-glucose) (Sigma), 5 gramas de cloreto de sódio (NaCl) (VWR) e 10 gramas de amido solúvel (VWR). Para a preparação deste meio, os diferentes componentes foram colocados numa "plataforma" de plástico e de seguida depositados num frasco juntamente com o volume de água definido. O meio foi então colocado numa placa de agitação e aquecimento com um magnete de forma a alcançar homogeneidade. De seguida, este foi distribuído por tubos num volume de 10 ml e esses tubos são a 121°C durante 15 minutos. Este meio tem como objetivo o crescimento de organismos aeróbios e anaeróbios facultativos. A proliferação destes microrganismos leva ao desenvolvimento de turbidez no meio, mas a sua observação direta no meio tende a ser difícil pelo que uma subcultura é feita em agar dextrose triptose (ADT).

7.4.3. Meio de cultura caldo agar dextrose triptose (ADT)

A constituição do meio de cultura de agar dextrose triptose para um volume de 1000 ml de água desionizada é a seguinte: 3 gramas de extrato de carne, 10 gramas de triptose (peptona tríptica de carne) (Merck), 5 gramas de dextrose (D-glucose) (Sigma), 5 gramas de cloreto de sódio (NaCl) (VWR) e 15 gramas de ágar (Oxoid). Para a preparação deste meio os diferentes componentes foram colocados numa "plataforma" de plástico e de seguida depositados num frasco juntamente com o volume de água definido. O meio foi então colocado numa placa de agitação e aquecimento com um magnete de forma a alcançar homogeneidade e permitir a dissolução do agar. De seguida, 5 ml do meio são distribuídos para tubos sendo estes colocados na autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após terminar o processo de autoclavagem, os tubos são colocados numa posição de inclinação até solidificarem de forma a formar uma rampa. Este meio permite a pesquisa de microrganismos aeróbios mesofílicos e termofílicos sobretudo aqueles associados a fenómenos "flat sour".

7.4.4. Meio de cultura extrato de carne e levedura (ECL)

A constituição do meio de cultura de extrato de carne e levedura para um volume de 1000 ml de água desionizada, é a seguinte: 10 gramas de triptose (peptona trípica de carne) (Merck), 4 gramas de extrato de carne (Biokar), 5 gramas de extrato de levedura (Merck), 3,2 gramas de dextrose (D-glucose) (Merck), 0,3 g de cloridrato de L-cisteína (Merck), 5 g de cloreto de sódio (VWR) e 6 gramas de ágar (Oxoid). Para a preparação deste meio os diferentes componentes foram colocados numa "plataforma" de plástico e de seguida depositados num frasco juntamente com o volume de água definido. O meio foi então colocado numa placa de agitação e aquecimento com um magnete de forma a alcançar homogeneidade e permitir a dissolução do agar. De seguida, 10 ml do meio são distribuídos para tubos que são colocados na autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavagem estes solidificam em posição vertical. Este meio permite a investigação de microrganismos anaeróbios.

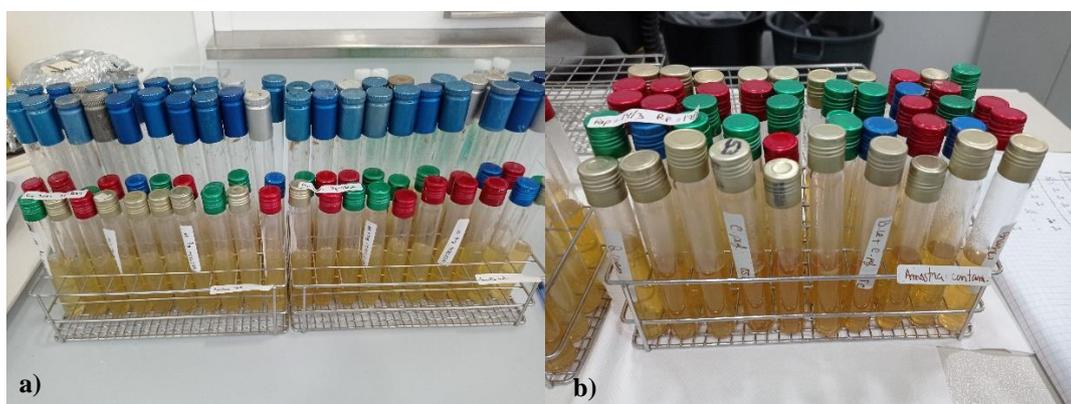


Figura 16: Meios de cultura utilizados para conservas de categoria 1 ($\text{pH} > 4,5$). Na figura a) podem ser observados os meios tioglicolato, DTA, ADT e ECL de trás para a frente estando presentes dois suportes para ensaios a 37 e 55 °C. A figura b) representa um suporte dos meios ADT e ECL onde os tubos da frente permaneceram a incubar durante 6 dias enquanto os de trás serviram para a repicagem de meios líquidos.

7.4.5. Meio de cultura sólido de Man, Rogosa e Sharpe (MRS)

O meio de cultura sólido Man, Rogosa e Sharpe já preparado da Oxoid, para um volume de 1000 ml, apresenta a seguinte composição: 10 gramas de peptona, 8 gramas de Lab-Lemco Powder, 4 gramas de extrato de levedura, 20 gramas de glucose, 1 ml de monooleato de sorbitano, 2 gramas de hidrogenofosfato dipotássio, 5 gramas de acetato de sódio, 2 gramas de citrato triamónico, 0,2 gramas de sulfato de magnésio e 0,05 gramas de sulfato de manganês. O meio é adicionado ao respetivo volume de água e colocado numa placa de agitação e aquecimento com um magnete até se obter homogeneidade. De seguida, 10 ml do meio são distribuídos em tubos que são colocados num autoclave a 121°C durante 15 minutos. Este é um

meio seletivo para bactérias do ácido láctico dos seguintes géneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc*.

7.4.6. Meio de cultura líquido de Man, Rogosa e Sharpe (MRS)

O meio de cultura sólido Man, Rogosa e Sharpe já preparado da Oxoid, para um volume de 1000 ml, apresenta a seguinte composição: 10 gramas de peptona, 8 gramas de Lab-Lemco Powder, 4 gramas de extrato de levedura, 20 gramas de glucose, 1 mL de sorbitan mono-oleate, 2 gramas de hidrogenofosfato dipotássio, 5 gramas de acetato de sódio, gramas g de citrato triamónico, 0,2 gramas de sulfato de magnésio e 0,05 gramas de sulfato de magnésio. O meio é adicionado ao respetivo volume de água e colocado numa placa de agitação e aquecimento com um magnete até se obter homogeneidade. De seguida, 10 ml do meio foram distribuídos em tubos que são colocados num autoclave a 121°C durante 15 minutos. Este meio é utilizado para a identificação das bactérias do ácido láctico.

7.4.7. Meio de cultura para pesquisa de *Bacillus Thermoacidurans*

O meio de cultura sólido para pesquisa de *Bacillus thermoacidurans* também chamado *Bacillus coagulans* já preparado da Sigma-Aldrich, para um volume de 1000 ml, apresenta a seguinte composição: 5 gramas de extrato de levedura, 5 gramas de proteose peptona, 5 gramas de dextrose (D-glucose), 4 gramas de fosfato dipotássio, 0,2 gramas de sulfato de magnésio, 20 gramas de agar. O meio é adicionado ao respetivo volume de água e colocado numa placa de agitação e aquecimento com um magnete até se obter homogeneidade. De seguida, é colocado num autoclave a 121°C durante 15 minutos. Este meio é seletivo para o isolamento e cultura de *Bacillus coagulans*.



Figura 17: Meio de pesquisa de *Bacillus Coagulans*.

7.4.8. Meio de cultura Cooke Rose Bengal

O meio de cultura Cooke Rose Bengal da Oxoid é constituído, para um volume de 1000 mL, por: 10 gramas de glucose, 1 grama de sulfato de potássio, 0,5 gramas de sulfato de magnésio, 0,05 gramas de Rose-Bengal, 15,5 gramas de ágar, 5,0 gramas de peptona e cloranfenicol. O meio é adicionado ao respetivo volume de água e colocado numa placa de agitação e aquecimento com um magnete até se obter homogeneidade. De seguida, é colocado num autoclave a 121°C durante 5 minutos. Este meio é utilizado para o isolamento de fungos e leveduras.



Figura 18: Meios utilizados para amostras de categoria 2 ($\text{pH} < 4,5$) não incluindo produtos à base de tomate. Os três tubos de meio líquido e meios sólido correspondem aos meios caldo MRS e MRS agar respetivamente. As 5 placas foram utilizadas para plaqueamento com meio Cooke Rose Bengal.

8. Resultados e discussão

8.1. Resultados da amostragem para o método da esterilidade e estabilidade

Microrganismos encontram-se amplamente distribuídos por todo o tipo de meios e superfícies pelo que as suas características e condições de desenvolvimento variam fortemente. Este fator é de grande importância para a indústria alimentar considerando que qualquer alimento deve passar por um processo de controlo rigoroso para assegurar que pode ser consumido de forma segura pela população. O desenvolvimento de microrganismos pode ter efeitos desejáveis ou indesejáveis uma vez que em certos tipos de produtos desenvolvimento de microrganismos é considerado um aspeto positivo, sendo estes vendidos como alimentos probióticos, porque estes organismos providenciam ao consumidor benefícios para a sua saúde em diversos aspetos sejam esses relativos a problemas físicos como doenças cardiovasculares ou na regulação de aspetos que apresentam um impacto na saúde mental (DiRienzo, 2014; Ruth Ann e Foster, 2015). No caso das conservas alimentares, a proliferação de microrganismos acarreta geralmente consequências de natureza negativa. Estes são organismos resistentes a condições adversas apresentando característica como resistência a temperaturas altas pela produção de esporos e com a capacidade de reduzir o valor nutricional do alimento pela utilização dos nutrientes nesse meio. Para além disso, os seus processos metabólicos resultam da síntese de metabolitos secundários que alteram as características dos alimentos tais como o cheiro e odor que os tornam menos apelativos aos consumidores, que pode colocar em risco a sua saúde e existe o risco de apresentarem a capacidade de proliferarem no organismo humano alterando o equilíbrio microbiológico já existente podendo mesmo provocar a morte no indivíduo no pior dos casos.

A contaminação do produto por microrganismos pode ocorrer em diversas fases da produção desde o manuseamento da matéria-prima, o próprio processo de esterilização se pouco adequado ao produto até à expedição final. Por estas razões, a análise microbiológica das conservas é um aspeto de enorme importância na indústria alimentar para garantir a estabilidade e esterilidade destas e verificar que se encontram dentro dos parâmetros, tais como as condições

de higiene e nível de adequação do tratamento térmico, estabelecidos pela legislação nacional e internacional em vigor.

Os resultados obtidos ao longo do trabalho para a esterilidade estão registados de forma generalizada na Tabela 6 onde se encontram os resultados para a esterilidade e, de forma limitada quando comparado a todo o processo delineado pela norma, para a estabilidade de diferentes conservas. Estas resultam num total de 40 amostras no qual foram realizados 66 ensaios dos quais 46 foram contaminados com *C. perfringens*, *B. cereus*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Z. rouxii* e *E. coli* e 20 foram não contaminados. Inicialmente a validação e implementação do método teria sido feita segundo o definido na ISO 16140-3: 2021, mas a pedido da empresa esta ideia foi alterada a favor de seguir o protocolo interno PCQ 33.12.

Tabela 6: Caracterização das 40 amostras e 66 ensaios para validação da esterilidade e estabilidade.

Número da amostra	Ensaio	Produto	Contaminação	Prova de estabilidade	Esterilidade
1	1	Atum em azeite	<i>B. cereus</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
2	2	Atum em azeite	<i>B. cereus</i> , <i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
3	3	Atum em azeite	<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
4	4	Cavala grelhada natural	<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
	5		<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
5	6	Cavala grelhada natural	<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
	7		<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
6	8	Cavala grelhada em azeite	<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
	9		<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
7	10	Molho de tomate	-	Estável	Estéril
	11			Estável	Estéril
8	12	Cogumelos enlatados	<i>L. fermentum</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
	13			Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
9	14	Cogumelos enlatados	<i>B. cereus</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
	15			Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
10	16	Cogumelos enlatados	<i>L. fermentum</i> , <i>B. cereus</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
	17			Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
11	18	Tremoços em conserva	-	Estável	Estéril
12	19	Sardinha em tomate picante	-	Estável	Estéril
	20			Estável	Estéril
13	21	Feijão Branco	-	Estável	Estéril
	22			Estável	Estéril

14	23	Sardinha em azeite	-	Estável	Estétil
	24			Estável	Estétil
15	25	Atum em conserva natural	-	Estável	Estétil
	26			Estável	Estétil
16	27	Atum em conserva natural	-	Estável	Estétil
	28			Estável	Estétil
17	29	Sardinha em molho de tomate	-	Estável	Estétil
18	30	Tremoços em conserva	-	Estável	Estétil
	31			Estável	Estétil
19	32	Sardinha em azeite	<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
	33			Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
20	34	Salsicha de aves	<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
	35			Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
21	36	Feijoada transmontana	<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
	37			Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
22	38	Polpa de tomate	-	Estável	Estétil
23	39	Polpa de tomate	-	Estável	Estétil
24	40	Polpa de tomate	-	Estável	Estétil
25	41	Pêssego em calda	<i>L. fermentum</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
	42			Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
26	43	Ananás em calda	<i>L. fermentum</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
	44			Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
27	45	Tomate pelado	<i>L. fermentum</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
	46			Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
28	47	Salsicha de aves	<i>E. coli</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
	48			Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
29	49	Salada de fruta	<i>Z. rouxii, B. cereus</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
	50			Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
30	51	Feijão preto	<i>Z. rouxii, B. cereus</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
	52			Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
31	53	sardinha em azeite	<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
32	54	Patê de sardinha	<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
33	55	Sardinha em água	<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
	56		<i>C. perfringens</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável
34	57	Tomate pelado	<i>L. fermentum</i>	Não estável	Não estétil, microbiologicamente instável

	58			Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
35	59	Polpa de maracujá	<i>L. fermentum</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
	60			Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
36	61	Feijoada transmontana	<i>B. cereus, E.coli</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
	62			Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
37	63	Sardinha em azeite	-	Estável	Estéril
38	64	Feijão preto	<i>B. cereus, E. coli</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
39	65	Sardinha em azeite	<i>B. cereus, E. coli</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável
40	66	Patê de atum	<i>B. cereus, E. coli</i>	Não estável	Não estéril, microbiologicamente instável

Segundo a Tabela 6, verifica-se que dos 66 ensaios utilizados 46 correspondentes às amostras contaminadas apresentam um resultado de não estável e não estéril e microbiologicamente instável correspondendo estes a aproximadamente 70% dos resultados obtidos enquanto os restantes correspondem às 20 amostras não contaminadas representando 30% dos resultados.

8.2. Parâmetros de validação

Os parâmetros para validação do método foram utilizados segundo o PCQ.33.12 para garantir que o método pode ser exercido com credibilidade e os resultados apresentem uma elevada qualidade e fiabilidade. Assim sendo, os parâmetros determinados foram a **eficiência**, **especificidade**, **falsos negativos**, **falsos positivos**, **seletividade** e **sensibilidade**.

8.2.1. Eficiência

A eficiência é a soma entre o número de ensaios presuntivos verdadeiros e o número de ensaios não presuntivos verdadeiros a dividir pelo número total de ensaios. Segundo a equação 7:

$$Eficiência = \frac{a+d}{n} = \frac{46+20}{66} * 100 = 100\% \quad \text{(Equação 7)}$$

Para os resultados obtidos a eficiência do método equivale a 100%.

8.2.2. Especificidade

A especificidade é igual à divisão entre o número de ensaios não presuntivos verdadeiros dividido pela soma de ensaios não presuntivos verdadeiros e ensaios presuntivos falsos. Segundo a equação 8:

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{c+d} = \frac{20}{0+20} * 100 = 100\% \quad \text{(Equação 8)}$$

Para que seja aceite este parâmetro tende a situar-se acima dos 80% para a validação de um método e os resultados acima indicam um valor de 100% pelo que a especificidade pode ser considerada satisfatória.

8.2.3. Falsos negativos e falsos positivos

A taxa de falsos negativos é igual à divisão entre o número de ensaios não considerados presuntivos, mas verdadeiros dividindo pela soma entre o número de ensaios não considerados presuntivos, mas verdadeiros e o número de ensaios não presuntivos verdadeiros. Segundo a equação 9:

$$\text{Taxa de falsos negativos} = \frac{b}{b+d} = \frac{0}{0+20} * 100 = 0\% \quad \text{(Equação 9)}$$

A taxa de falsos positivos é determinada pelo número de ensaios presuntivos, mas que são falsos pela divisão da soma do número de ensaios presuntivos que são verdadeiros com a soma do número de ensaios presuntivos, mas que são falsos. Segundo a equação 10:

$$\text{Taxa de falsos positivos} = \frac{c}{c+a} = \frac{0}{0+46} * 100 = 0\% \quad \text{(Equação 10)}$$

Estes parâmetros são importantes para a relevância do método uma vez que se associa à capacidade de deteção do organismo alvo em relação a outros organismos que possam desenvolver-se no meio ou à possibilidade de este não ser detetado mesmo sabendo que ele está presente. Nesta situação ambos tem um valor de 0% para ambos métodos.

8.2.4. Seletividade

A seletividade é calculada pela divisão do número de ensaios presuntivos que são verdadeiros pelo número total de ensaios. Segundo a equação 11:

$$\text{Seletividade} = \frac{a}{n} = \frac{46}{66} * 100 = 23\% \quad \text{(Equação 11)}$$

Os resultados para a seletividade apenas são válidos se o valor for superior a 10%. A percentagem obtida para foi de 23% pelo que este parâmetro é considerado como aceitável para a validação dos métodos.

8.2.5. Sensibilidade

A sensibilidade é calculada pelo número de ensaios presuntivos que são verdadeiros pela divisão da soma do número de ensaios presuntivos que são verdadeiros com o número de ensaios não considerados presuntivos, mas que são verdadeiros. Segundo a equação 12:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a+b} = \frac{46}{46+0} * 100 = 100\% \quad \text{(Equação 12)}$$

É um dos parâmetros mais importantes uma vez que permite avaliar a capacidade do método de determinar o organismo-alvo equivalente à fração de ensaios presuntivos e verdadeiros. Por esta razão, a sensibilidade desse apresentar um valor superior a 90% o que se verifica pelos resultados observados acima onde a sensibilidade obtida foi de 100%.

8.2.6. Parâmetros gerais

Os resultados obtidos para a validação do método para a esterilidade (NP-2309-2) e estabilidade (NP-4404-1) segundo o PCQ.33.12 encontram-se de acordo aos valores impostos para garantir que o método é credível e funciona para o objetivo entendido pelo que pode ser aplicado. Nas Tabela 7 e 8 estão registados os resultados obtidos durante o trabalho:

Tabela 7: Resultados obtidos nos 66 ensaios para validação do método da esterilidade (NP-2309-2) e estabilidade (NP-4404-1) (Adaptado de Silliker,2020).

Amostras	Ensaio	Ensaio de amostras contaminadas artificialmente	Ensaio de Amostras não contaminadas (analisadas em paralelo ou duplicado)	Ensaio de amostras contaminadas naturalmente
40	66	46	20	0

Tabela 8: Resultados obtidos nos 66 ensaios para validação do método da esterilidade (NP-2309-2) e estabilidade (NP-4404-1) para avaliação dos parâmetros (Adaptado de Silliker,2020).

		Presuntivos		
		+	-	
Confirmados / Verdadeiramente	+	a (verdadeiros positivos)	b (falsos negativos)	a+b
	-	c (falsos positivos)	d (verdadeiros negativos)	c+d
		a+c	b+d	n (número de testes)

		Presuntivos		
		+	-	
Confirmados / Verdadeiramente	+	46	0	46
	-	0	20	20
		46	20	66

Tabela 9: Parâmetros utilizados para validação do método e respetivos cálculos.

Eficiência	(a+d)/n	100
-------------------	----------------	------------

Especificidade	$d/(c+d)$	100
Falsos negativos	$b/(b+d)$	0
Falsos positivos	$c/(a+c)$	0
seletividade	a/n	23
sensibilidade	$a/(a+b)$	100

8.3. Validação segundo a ISO-16140-3: 2021

Inicialmente a validação do método da esterilidade teria sido feita segundo a ISO-16140-3:2021. Nesta situação, a validação do método da esterilidade teria sido feita segundo a metodologia para uma gama limitada de alimentos que consistiria na análise de 5 das diferentes categorias de alimentos definidos pela ISO. De seguida, seria aplicado o protocolo 3 onde cada amostra seria contaminada com inóculo com uma concentração de 3 a 5 CFU por porção de teste. Este procedimento seria realizado para 7 amostras e 1 branco terminando num total de 8 amostras sendo que, das 7 amostras contaminadas 6 teriam que ser positivas para validar uma dada categoria de alimento.

Durante o decorrer do trabalho esta metodologia foi alterada a favor da validação recorrendo ao método interno da empresa. Na Tabela 4 estão registadas as diferentes categorias de alimentos definidas pela ISO que foram realizadas juntamente com o número de ensaios. A contaminação foi feita sem determinar se o inóculo estava dentro da concentração referida entre 3 e 5 CFU, com exceção de algumas das amostras iniciais, pelo que os resultados não podem ser utilizados de forma credível para a validação das categorias apresentadas. Relativamente às categorias, apenas 2 poderiam ser validadas: produtos de peixe prontos a consumir e frutas e vegetais processados.

No geral, a validação da norma 2309-2:1988 e da NP-4404-1 não pode ser determinada segundo esta metodologia uma vez que o procedimento experimental realizado difere do indicado no documento e a quantidade de dados disponíveis não permite uma avaliação completa e fidedigna.

8.4. Prova de estabilidade

Durante a prova de estabilidade as amostras utilizadas foram submetidas a diversas provas como o exame ao exterior da embalagem, exame do conteúdo e medição do pH. O exame microscópico que apenas se aplica a amostras de grandes formatos (>1,5 kg) ou em variações de pH >0,3 e <0,5 não foi realizado. Uma amostra apenas é considerada estável se variações na embalagem, odor, aspeto não forem observadas após incubação e se a diferença de pH for <0,5 sem variação considerável na flora microbiana.

Na Tabela 10 estão indicadas as observações para cada uma das amostras de uma forma generalizada. No anexo 2, Tabela 1 encontram-se registados de uma forma detalhada todos os parâmetros aqui apresentados juntamente com os valores de pH medidos onde N.C corresponde a "não conforme", C corresponde a "conforme" e N.A. a "não aplicável".

Tabela 10: Parâmetros observados nas 40 amostras de conservas para avaliação da estabilidade segundo a NP-4404-1:2002.

Número da amostra	Exame externo à embalagem	Exame do conteúdo	Varição do pH
1	-	Não conforme	Não conforme
2	-	Não conforme	Não conforme
3	-	Não conforme	Não conforme
4	-	Não conforme	Não conforme
5	-	Não conforme	Não conforme
6	-	Não conforme	Não conforme
7	Conforme	Conforme	Conforme
8	-	Não conforme	Não conforme
9	-	Não conforme	Não conforme
10	-	Não conforme	Não conforme
11	Conforme	Conforme	Conforme
12	Conforme	Conforme	Conforme
13	Conforme	Conforme	Conforme
14	Conforme	Conforme	Conforme
15	Conforme	Conforme	Conforme
16	Conforme	Conforme	Conforme
17	Conforme	Conforme	Conforme
18	Conforme	Conforme	Conforme
19	-	Não conforme	Não conforme

20	-	Não conforme	Não conforme
21	-	Não conforme	Não conforme
22	Conforme	Conforme	Conforme
23	Conforme	Conforme	Conforme
24	Conforme	Conforme	Conforme
25	-	Não conforme	Não conforme
26	-	Não conforme	Não conforme
27	-	Não conforme	Não conforme
28	-	Não conforme	Não conforme
29	-	Não conforme	Não conforme
30	-	Não conforme	Não conforme
31	-	Não conforme	Não conforme
32	-	Não conforme	Não conforme
33	-	Não conforme	Não conforme
34	-	Não conforme	Não conforme
35	-	Não conforme	Não conforme
36	-	Não conforme	Não conforme
37	Conforme	Conforme	Conforme
38	-	Não conforme	Não conforme
39	-	Não conforme	Não conforme
40	-	Não conforme	Não conforme

Conforme os resultados registados no anexo 2 - Tabela 1, as amostras classificadas como não estáveis pertencem às amostras contaminadas artificialmente, correspondendo a cerca de 70% do total da amostragem, enquanto as amostras não contaminadas foram avaliadas como estáveis. Das amostras não estáveis observa-se que a variação de pH, proveniente da produção de ácidos e gás resultantes da respiração anaeróbia à qual estiveram sujeitas, apresenta valores universalmente superiores a 0,3 e em grande parte dos casos superior a 0,5 para a temperatura de 37°C estando de acordo à natureza mesófila dos organismos utilizados. Para a temperatura de 55.°C as variações de pH são geralmente menores, mas frequentemente superiores ou próximas a 0,3 uma vez que nenhum dos organismos apresenta uma resistência elevada a temperaturas altas pelo que este fator provou ser limitante no seu desenvolvimento o que pode também ser verificado na prova de esterilidade. No entanto, a proximidade uma diferença de pH igual ou superior a 0,3 a 55°C não seria suficiente para garantir a instabilidade da conserva uma vez que para tal a diferença teria de ser superior a 0,5. Para obter esta confirmação o exame e de microscópio teria de ser aplicado para observar a variação da flora microbiana. Assim sendo, as amostras consideradas não estáveis com uma variação de pH inferior a 0,5 são avaliadas desta forma pelo conhecimento prévio que a amostra foi de facto contaminada, mas em situação real de laboratório a confirmação por exame de microscópio é necessária.

8.5. Prova de esterilidade

Para avaliação da esterilidade em conservas, as amostras foram incubadas a 37°C e 55°C para observação do desenvolvimento de organismos mesófilos e termófilos respetivamente. De acordo à norma atualmente em vigor que rege a avaliação da qualidade das conservas, uma conserva alimentar pode ser considerada: conserva estéril; conserva comercialmente estéril e microbiologicamente estável e conserva não estéril e microbiologicamente instável.

Na Tabela 11 estão indicados os resultados generalizados para a esterilidade das 40 amostras para o objetivo pretendido da validação deste método. No anexo 2 - Tabela 1 encontram-se estes parâmetros de uma forma mais detalhada indicando os meios utilizados juntamente com o número de resultados positivos para cada um desses meios nas diferentes temperaturas mencionadas.

Tabela 11: Resultados para a as 40 amostras analisadas segundo o definido na norma NP-2309-2:1988.

Número da amostra	Esterilidade a 37°C	Esterilidade a 55°C
1	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
2	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
3	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
4	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
5	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
6	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
7	Estéril	Estéril
8	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
9	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
10	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
11	Estéril	Estéril
12	Estéril	Estéril
13	Estéril	Estéril
14	Estéril	Estéril
15	Estéril	Estéril
16	Estéril	Estéril
17	Estéril	Estéril
18	Estéril	Estéril
19	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
20	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
21	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
22	Estéril	Estéril

23	Estéril	Estéril
24	Estéril	Estéril
25	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
26	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
27	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
28	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
29	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
30	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
31	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
32	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
33	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
34	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
35	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
36	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
37	Estéril	Estéril
38	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
39	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável
40	Não estéril, microbiologicamente instável	Não estéril, microbiologicamente instável

Os resultados obtidos nas provas de esterilidade indicam que as amostras contaminadas, representando um total de 70% do total de amostras, apresentam resultados positivos, ou seja, ocorreu desenvolvimento dos organismos alvo nos meios de cultura. As restantes amostras não contaminadas não apresentam crescimento concluindo que estas se encontram estéreis.

Todas as amostras contaminadas foram obtidas por contaminação artificial, recorrendo a DPCS, com organismos de características predominantemente mesófilas pelo que ensaios a 55°C apresentam resultados negativos. Mesmo assim, estas amostras são designadas como **não estéreis e microbiologicamente instáveis** uma vez que outras observações tais como a leitura do pH ou a observação do conteúdo permitem observar que a certo ponto ocorreram alterações desencadeadas pelos organismos mesmo que estas tenham sido limitadas em comparação à temperatura de 37°C.

As amostras contaminadas por *Clostridium perfringens* foram matrizes de carne e peixe representando um meio ideal para a propagação deste organismo uma vez que se desenvolve melhor em alimentos ricos em proteína animal (ASE). O organismo consegue proliferar em meios com pH entre 5,5 e 9 com uma gama ideal de 6,0 a 7,0 correspondendo estes a conservas pertencentes à categoria 1 onde as conservas de carne e peixe se encontram (ASAE, Doyle, 2002). O organismo aguenta em temperaturas dos 12 aos 47°C sendo então considerado um organismo mesófilo com uma temperatura ideal de 43 a 47°C. Apesar disto, os seus esporos apresentam resistência elevada à temperatura. É considerado um anaeróbio obrigatório apesar

de alguns estudos indicarem que este tem a capacidade de resistir em ambiente com oxigênio durante algum tempo (Jean et al., 2004). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo a estas características uma vez que o crescimento se apresentou mais limitado nos meios DTA e ADT que favorecem microrganismos aeróbios enquanto o meio ECL para organismos anaeróbios apresenta resultados positivos com consistência. Os resultados positivos observados em DTA e ADT podem dever-se a casos de contaminação cruzada com outro organismo como *Bacillus cereus* uma vez que várias amostras e ensaios foram preparados e contaminados simultaneamente.

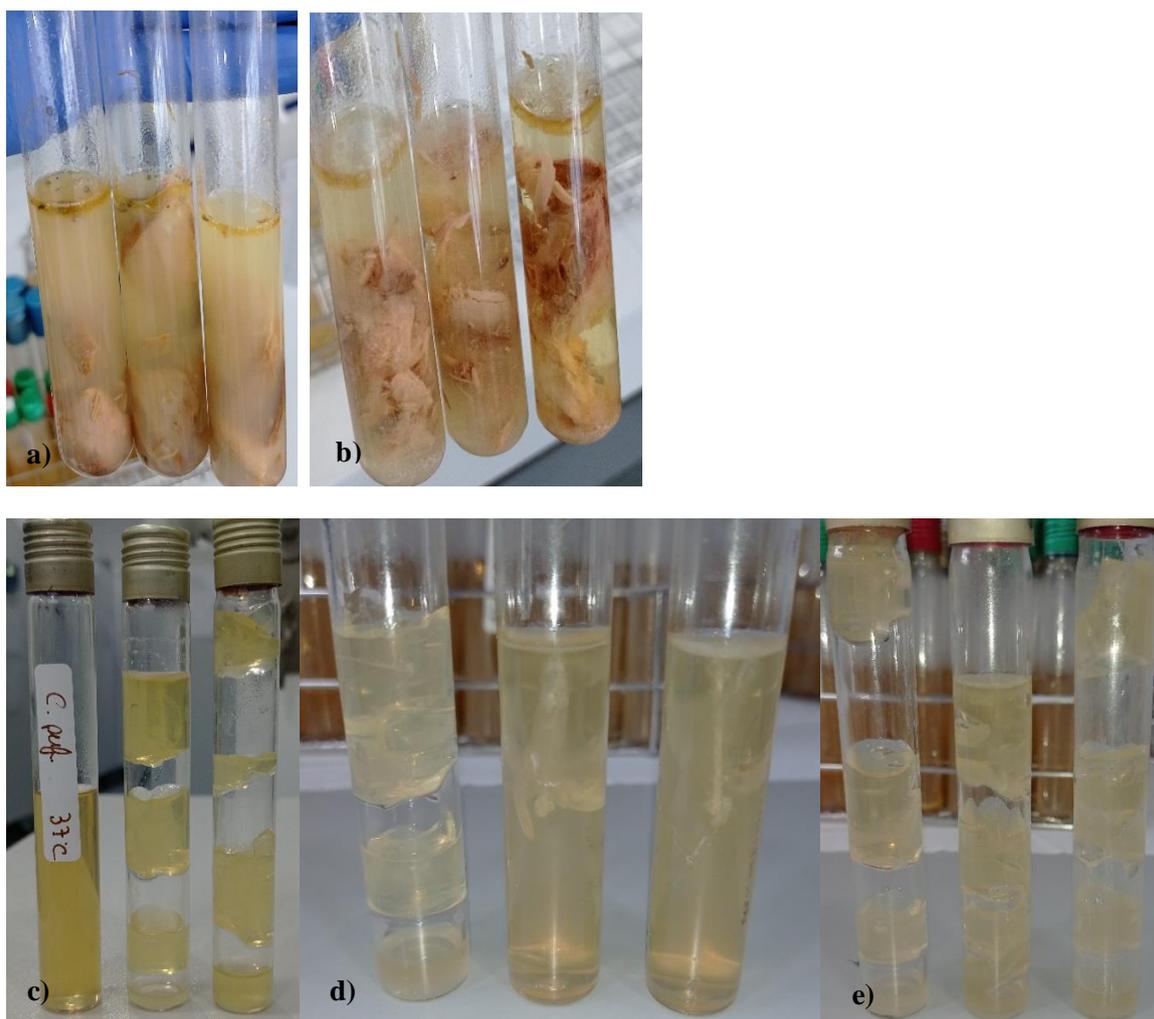


Figura 19: Crescimento de *Clostridium perfringens* nos meios Tioglicolato (a), DTA (b) e ECL nas amostras 3 (c), 33 (d) e 20 (e). Todas as amostras imagens para ECL são após a repicagem a partir de tioglicolato.

Bacillus cereus foi utilizado para a contaminação de diversas matrizes alimentares, tal como no caso de *C. perfringens* para produtos ricos em proteína animal, mas também para produtos vegetais. Com uma gama pH para crescimento de 5 a 9,3 (ASAE) conservas de categoria 2 foram utilizadas para garantir a sua sobrevivência. Com a capacidade de crescer num intervalo de temperatura entre 10 e 50°C e uma temperatura ideal entre 28 e 35°C (ASAE, Doyle, 2002) é um organismo mesófilo comprovado pela ausência de crescimento nas amostras incubadas a 55°C. Sendo um organismo anaeróbio facultativo pode proliferar na presença ou ausência de oxigénio tornando a sua distribuição superior à de *C. perfringens* pelos meios de cultura utilizados, isto é, dadas as suas características pode crescer em todos os meios utilizados.

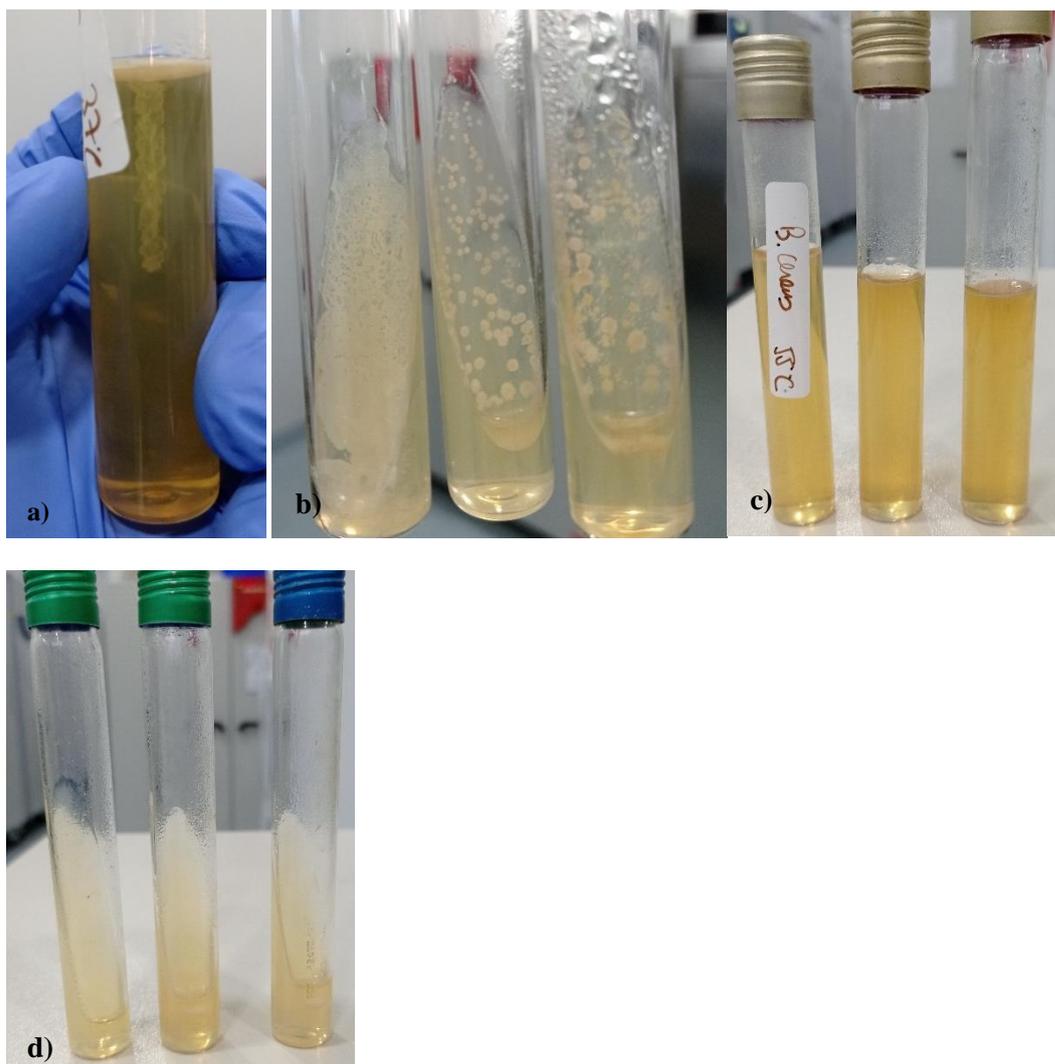


Figura 20: Crescimento de *Bacillus cereus* na amostra 1 nos meios ECI (a) e ADT (b) pré repicagem a 37 °C. Crescimento de *Bacillus cereus* na amostra 1 nos meios ECI (c) e ADT (d) pré repicagem a 55 °C.

Escherichia coli foi utilizada para a contaminação de produtos de categoria 2 de origem animal e vegetal produzindo resultados positivos para ambas matrizes comprovando a sua distribuição por uma larga gama de alimentos (CDC). Cresce num intervalo de temperatura entre 7 e 46°C com a temperatura ideal de 35 a 40°C e confirma-se pelos resultados o seu comportamento mesófilo. Relativamente ao pH devido à sua presença no intestino humano pode aguentar valores entre 4,5 e 9 (Wilks e Joan, 2007) mas apresenta um pH ideal de 6,5 a 7,5 (Philip et al., 2018) estando incluídos nestes últimos valores a grande parte das conservas de carne e peixe. É um organismo anaeróbio facultativo pelo que tal como no caso de *B. cereus* apresenta a capacidade de crescer em todos os meios utilizados.

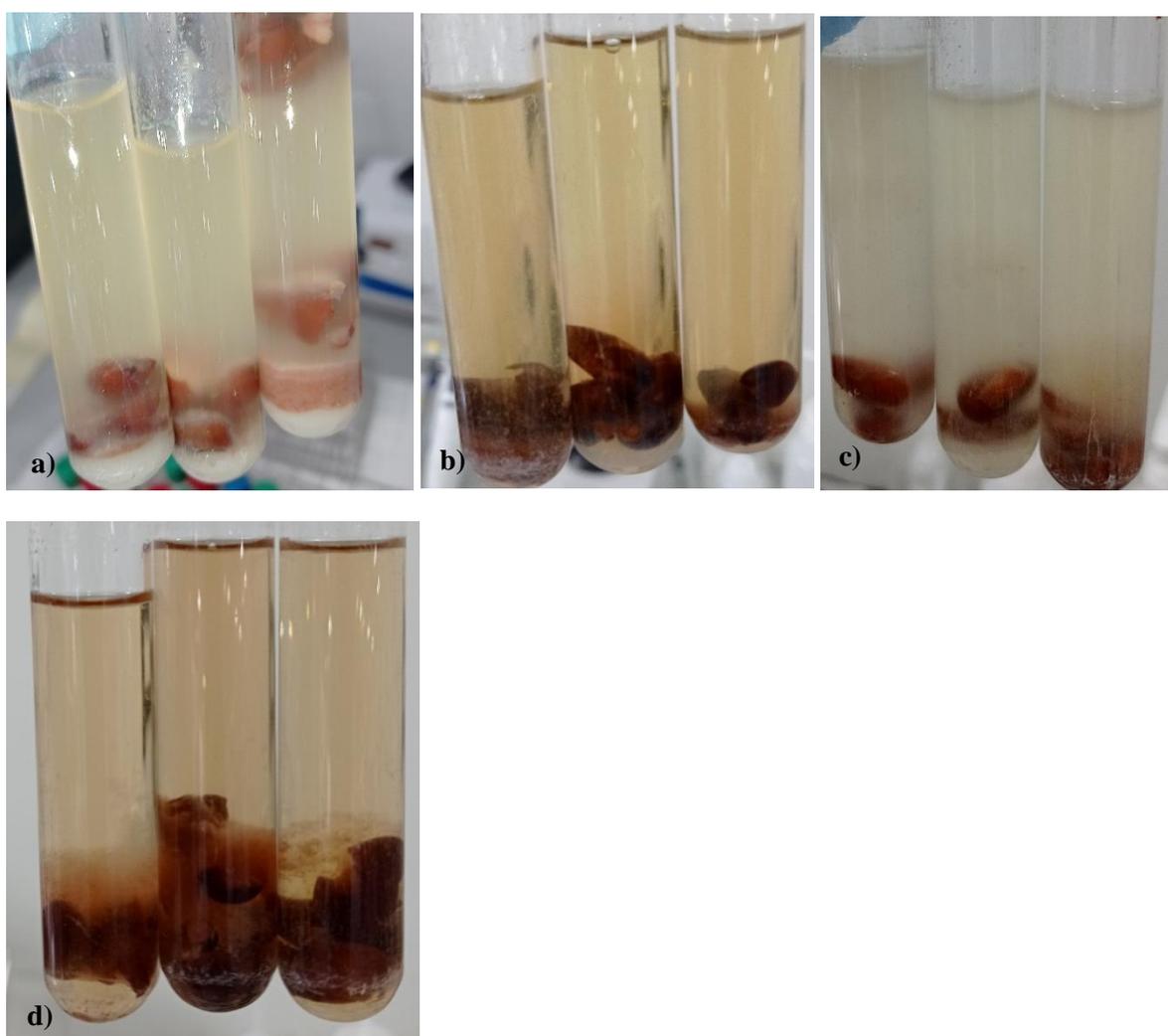


Figura 21: Comparação na amostra 38 entre meio DTA a 37 °C (a) e 55 °C (b) e meio tioglicolato a 37 °C (c) e 55 °C (d).

Através da figura 21 correspondendo aos meios líquidos da amostra 38 contaminada por *E. coli* e *B. cereus* é possível observar claramente a distinção entre os meios líquidos

contaminados resultando em turbidez após incubação a 37°C e os meios líquidos após incubação a 55°C.

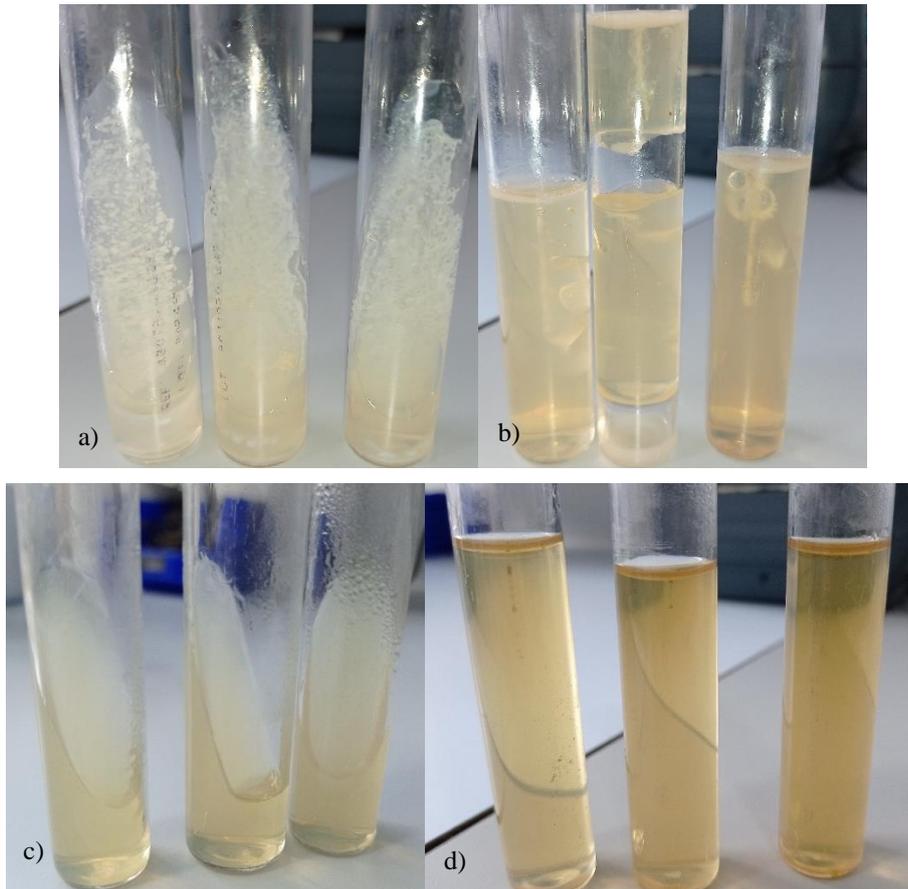


Figura 22: Amostra 40 após nos meios ADT (a,c) e ECL (b,d) após incubada a 37 °C (a, b) e 55 °C (c,d).

C. perfringens, *B. cereus* e *E. coli* são considerados alguns dos organismos com maior impacto na área alimentar devido à sua prevalência e distribuição ubíqua no ambiente juntamente com o impacto que apresentam na saúde humana após o seu consumo. Tal como observado neste trabalho, temperaturas elevadas provaram ser um fator limitante no desenvolvimento destes microrganismos pelo que contaminações que possam surgir em conservas relativas a estes devem-se predominantemente a falhas no sistema de produção nomeadamente tratamento térmico insuficiente e no armazenamento em condições inadequadas que permita ao desenvolvimento de esporos ou até mesmo a infiltração destes na matriz alimentar (Landry et al., 2001)

Ao contrário do observado nos restantes organismos *Limisolactobacillus fermentum* não é considerado um organismo com impacto negativo na saúde humana apresentando até potencial como probiótico (Tulumoğlu et al., 2014; Karim et al., 2020). Através dos resultados

obtidos pode concluir-se que *L. fermentum* é um organismo anaeróbio facultativo apresentando crescimento em todos os meios. A contaminação com este microrganismo foi realizada em conservas de categoria 2 devido à sua capacidade de resistir a pH baixo. Das contaminações realizadas com *L. fermentum* destacam-se os produtos à base de tomate onde microrganismos do género *Lactobacillus* são dos principais responsáveis pela sua degradação uma vez que são dos poucos capazes de proliferar nesse meio (André et al., 2017)

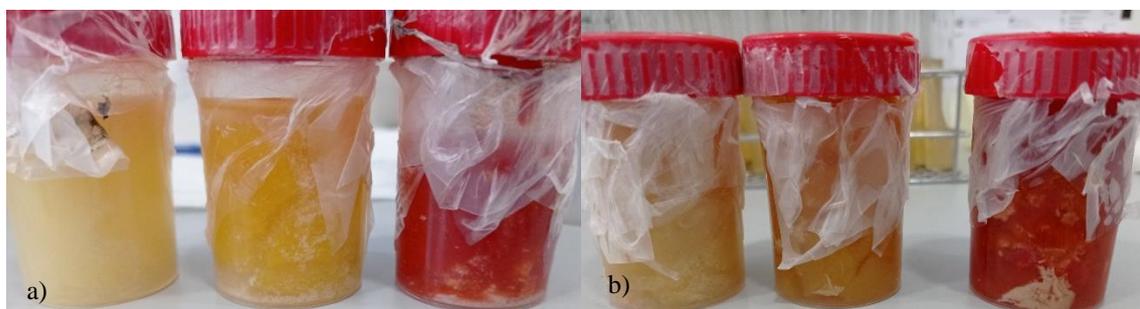


Figura 23: Amostras 26, 27 e 27 contaminadas com *L. fermentum* após incubação a 37 °C (a) e 55 °C (b).

Em relação à temperatura foi possível observar alterações no aspeto da matriz alimentar a 37°C e 55°C tal como demonstrado na figura 23. No entanto, o desenvolvimento nos meios para observação da esterilidade apenas resultou positivos à temperatura de 37°C. *L. fermentum* pertence ao género *Limosilactobacillus* que apresenta uma resistência superior à temperatura elevada. (Zheng et al., 2020) para além da função protetora das pectinas do tomate que também contribuem para essa resistência (Juven ey al., 1983). Porém, ocorreu alteração do pH pelo que a conserva foi considerada como não estéril. Os meios MRS resultaram em desenvolvimento tal como esperado considerando a especificidade destes para o género *Lactobacillus* e outros associados.

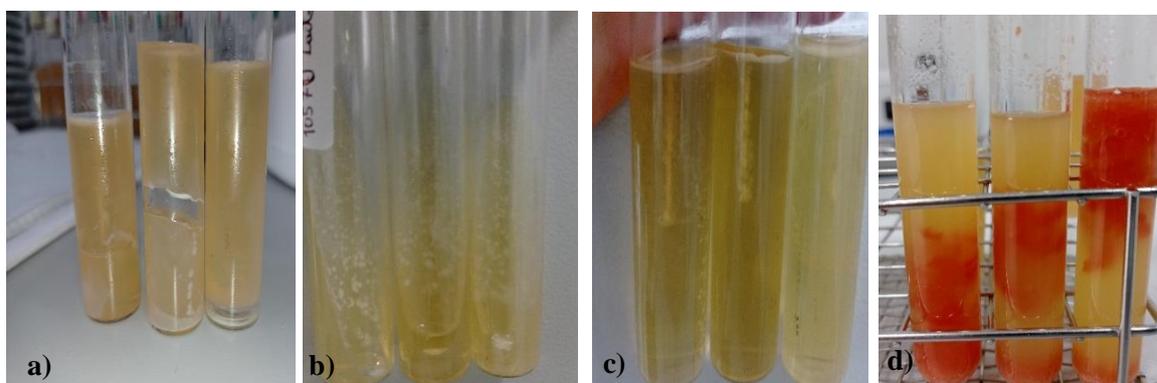


Figura 24: Amostra 34 após incubação nos meios MRS ágar (a), ADT (b), ECL (c) e caldo MRS (d).

No meio Ágar Thermoacidurans para pesquisa de *Bacillus coagulans*, os resultados obtidos foram negativos para 37 e 55°C provavelmente devido à especificidade do meio e este organismo não ser o organismo alvo.

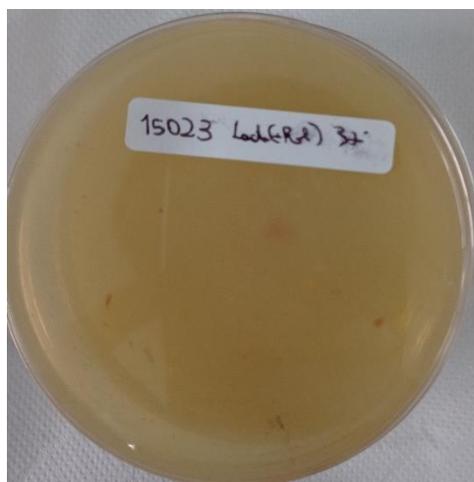


Figura 25: Meio Thermoacidurans Ágar para a amostra 34 incubada a 37 °C.

Zygosaccharomyces rouxii é uma levedura utilizada para a produção de molho de soja com características semelhantes a organismos pertencente ao género *Saccharomyces* mas também está associada à degradação de alimentos (Romano et al., 1993). Apresenta elevada resistência a estresse osmótico permitindo o seu crescimento em meios ricos em açúcares como sumos, ketchup, compotas, molho de tomate, vinhos e outros (Esteve-Zarzoso et al., 2003; Steels et al., 1999). Para além disso, resiste a concentrações elevadas de ácidos orgânicos no meio, baixo pH e concentrações baixas de oxigénio ou mesmo em anaerobiose (Xiang et al., 2018). É um dos organismos mais xerófilos conhecidos com a capacidade de crescer alimentos com composição de até 70% de glucose (Dakal et al., 2014). Observando os resultados obtidos, estes estão de acordo a estas características, ou seja, o organismo cresceu nos meios para aeróbios e anaeróbios. Este crescimento foi apenas observado para as temperaturas de 37°C pelo que a 55°C é inibido. Nas contaminações realizadas com este organismo os resultados obtidos para o meio Cooke Rose Bengal foram positivos provando a sua presença no meio contaminado e a seletividade do meio para fungos e leveduras.

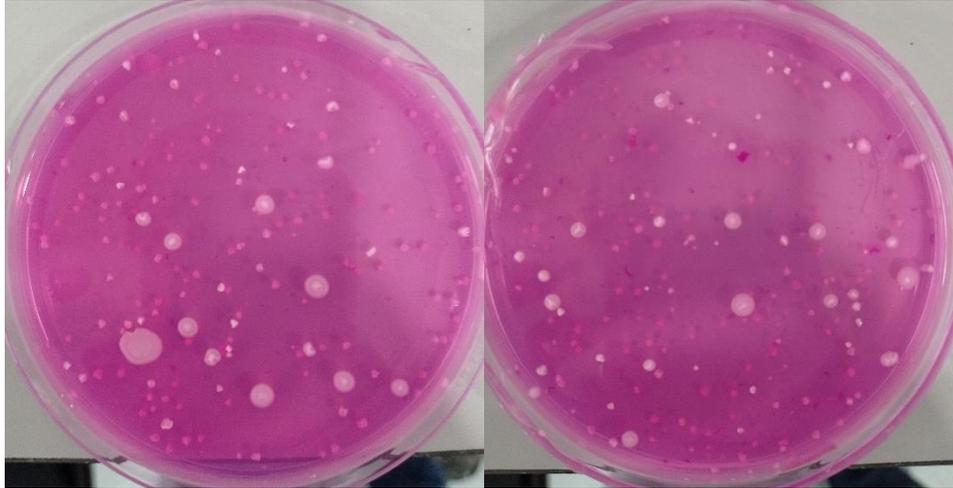


Figura 26: Crescimento de *Zygosaccharomyces rouxii* no meio Cooke Rose Bengal.

9. Conclusão

Atualmente, as conservas representam uma parte importante da alimentação à escala mundial devido a permitirem que alimentos naturalmente perecíveis possam aguentar meses ou anos se armazenados nas condições adequadas e devido a serem economicamente acessíveis a todos os estratos da sociedade. A prevalência destas faz com que a sua qualidade e segurança para consumo seja um dos fatores mais controlados na indústria alimentar. A esterilidade das conservas é obtida através de um tratamento térmico, mas este deve adequar-se à matriz em questão de forma a não danificar ou alterar as propriedades organoléticas do produto. De forma garantir a esterilidade e a controlar se o processo foi adequado são realizadas análises microbiológicas nomeadamente NP-2309-2 para a esterilidade e a NP-4404-1 para a estabilidade.

O objetivo deste trabalho era a validação do método da esterilidade, ou seja, a NP-2309-2. Para efeito de validação do método, inicialmente era pretendida a implementação da ISO-16140-3:2021, mas tal foi alterado a favor do procedimento de controlo da qualidade da empresa. Para esta metodologia foram contaminados diferentes tipos de conservas com vários microrganismos como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Limosilactobacillus fermentum* e *Zygosaccharomyces rouxii* no qual se aplicaram as normas de estabilidade e esterilidade. Através dos resultados obtidos foram então determinados os parâmetros de especificidade, de sensibilidade, da taxa de falsos positivos, da taxa de falsos negativos, da seletividade e da eficiência para validação do método. Os resultados obtidos para os parâmetros de validação estão dentro dos valores indicados permitindo concluir a conformidade e desempenho do método.

Concluindo, considerando a importância das análises microbiológicas na indústria alimentar, a validação de um método de forma a garantir que o desempenho deste está de acordo ao pretendido e os resultados obtidos são credíveis é um dos aspetos mais importantes para garantir a qualidade alimentar. A análise microbiológica das conservas é essencial para garantir a satisfação dos requisitos de qualidade e segurança ao longo da cadeia de produção especialmente no tratamento térmico de forma a distribuir aos consumidores um produto comercialmente estéril e estável.

10. Bibliografia

- Ababouch, L. (1999). Spoilage problems associated with canning. In: Robinson, R. K., Batt, C. A., Pattel, P. Encyclopedia of food microbiology, Academic Press, 1016-1023.
- André, Stéphane, Tatiana Vallaëys, and Stella Planchon. "Spore-forming bacteria responsible for food spoilage." *Research in Microbiology* 168.4 (2017): 379-387.
- ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica). *Bacillus cereus*. Retirado de <<https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/bacillus-cereus.aspx>>
- ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica). *Clostridium perfringens*. Retirado de <<https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/clostridium.aspx>>
- ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica). *Escherichia coli*. Retirado de <<https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx>>
- Azevedo, A., Martins, P., Martins, C., Neta, M. e Borges, R. (2011). "A Importância da Auditoria Interna no Processo de Implantação da Certificação ISO 9000. VII Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia."
- Biedermann M, and Grob K. 1998. "Food contamination from epoxy resins and organosols used as can coatings: Analysis by gradient NPLC". *Food Addit Contam.* 15:609-18.
- Boskou, Dimitrios, and Ibrahim Elmadfa, eds. "Frying of food: oxidation, nutrient and non-nutrient antioxidants, biologically active compounds and high temperatures". CRC Press, 2019.
- Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "canning". *Encyclopedia Britannica*, 15 de novembro de 2021. Retirado de <<https://www.britannica.com/topic/canning-food-processing>>.
- Instituto Português de Acreditação (IPAC), Certificado de Acreditação L0087, CA L0087. (2008).
- Canned Food Market by Product Type (Canned Meat & Seafood, Canned Fruit & Vegetables, Canned Ready Meals, and Others), Distribution Channel (Supermarket/Hypermarket, Convenience stores, E-commerce, and Others), and Type (Organic and Conventional): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2019-2026, Allied Market Research, janeiro 2020. Retirado de <<https://www.alliedmarketresearch.com/canned-food-market-A05939>>
- Chattopadhyay, M. K. 2014. "Use of antibiotics as feed additives: A burning question". *Frontiers in Microbiology* 5:334-334
- Comissão Europeia. Contaminants. Retirado de <https://ec.europa.eu/food/safety/chemical-safety/contaminants_pt>
- Coufal-Majewski, Stephanie, et al. "Impacts of cereal ergot in food animal production." *Frontiers in veterinary science* 3 (2016): 15.
- Darby, Michael R., and Edi Karni. "Free competition and the optimal amount of fraud." *The Journal of law and economics* 16.1 (1973): 67-88.
- Dakal, T.; Solieri, L.; Giudici, P. "Adaptive Response and Tolerance to Sugar and Salt Stress in the Food Yeast *Zygosaccharomyces Rouxii*". *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 185, 140-157.
- Delgado AE, Sun D-W (2001), "Heat and mass transfer models for predicting freezing processes-a review". *J Food Eng* 47(3):157-17.
- Dewanto V, Wu X, Adom K, et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2002; 50:3010- 3014.
- Dierick, Katelijne; Van Coillie, Els; Swiecicka, Izabela; Meyfroidt, Geert; et al. (August 2005). "Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning". *Journal of Clinical Microbiology.* 43 (8): 4277-4279.
- DiRienzo, Douglas B. "Effect of probiotics on biomarkers of cardiovascular disease: implications for heart-healthy diets." *Nutrition reviews* 72.1 (2014): 18-29.
- Doyle, M. Ellin. *Survival and growth of clostridium perfringens during the cooling step of thermal processing of meat products: a review of the scientific literature*. Food Research Institute, University of Wisconsin--Madison, 2002.
- Duar, Rebecca M., et al. "Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*." *FEMS microbiology reviews* 41. Supp_1 (2017): S27-S48.

- EFSA (European Food Safety Authority). 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*. 13:3978.
- Eder, W. E., and S. Hosnedl. "ISO 9000: 2005 Quality Management Systems–Fundamentals and Vocabulary." *Geneva: ISO* (2005).
- Elmassry, Moamen M., Ahmed Zayed, and Mohamed A. Farag. "Gut homeostasis and microbiota under attack: impact of the different types of food contaminants on gut health." *Critical reviews in food science and nutrition* (2020): 1-26.
- Errington, Jeffery, and Lizah T. van der Aart. "Microbe profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse." *Microbiology* 166.5 (2020): 425.
- Emanuele, F. (1946). *Teoría y técnica de la conservación de los alimentos*, Industria de las conservas, 2ªed., pp. 2-27, Ulrico Hoepli-Milano.
- Erten, H., Agirman, B., Boyaci-Gunduz, C. P., Carsanba, E., Leventdurur, S. (2019). "Natural Microflora of Different Types of Foods". In: Malik, A., Erginkaya, Z., Erten, H. *Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies*. Springer, 51-93.
- Esteve-Zarzoso, B.; Zorman, T.; Belloch, C.; Quero, A. "Molecular Characterisation of the Species of the Genus *Zyosaccharomyces*". *Syst. Appl. Microbiol.* 2003, 26, 404-411.
- EURACHEM. (2014). "Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics."
- Evancho, George M., Suzanne Tortorelli, and Virginia N. Scott. "Microbiological spoilage of canned foods." *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. Springer, New York, NY, 2009. 185-221.
- Feinstone, Stephen M. "History of the discovery of hepatitis A virus." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 9.5 (2019): a031740.
- Fellows, P. J. (2017). *Food Processing Technology Principles and Practice*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. pp. 563-578.
- Fennema, O. (1977), "Loss of vitamins in fresh and frozen foods". *Food Technol*, 31:32-38
Food Safety Information Council. "*Bacillus cereus* and other *Bacillus* species". Retirado de <<https://foodsafety.asn.au/bacillus-cereus/>>
- Food & Grocery Retail Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Packaged Food, Unpackaged Food), By Distribution Channel, By Region, And Segment Forecasts, 2020 - 2027, Maio 2020. Retirado de <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/food-grocery-retail-market>>
- IFAC (International Food Additives Council). "From Appert to the Ball brothers: a history of canning, International Food Additives Council". Retirado de <<https://www.foodingredientfacts.org/apperttotheballbrothers/>>.
- Gao XQ, and Wang HS. 2014. Impact of bisphenol a on the cardiovascular system - epidemiological and experimental evidence and molecular mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*. 11:8399-413.
- Geueke, B. "Dossier-Can Coatings." *Food Packaging Forum*. 2016. Retirado de <<https://www.foodpackagingforum.org/food-packaging-health/can-coatings>>
- Glass, Roger I., Umesh D. Parashar, and Mary K. Estes. "Norovirus gastroenteritis." *New England Journal of Medicine* 361.18 (2009): 1776-1785.
- Grupo EP, "Parâmetros Microbiológicos - *Clostridium perfringens*". Retirado de <<https://www.grupoep.com.br/clostridium-perfringens/>>
- ICH Harmonised Tripartite (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use). Guideline. "Validation of analytical procedures: text and methodology." Q2 (R1) 1.20 (2005): 05.
- Hallman, G., V. e Steven, R. G. (1932). *Sterilizing Canned Foods, Principles Involved in Determining Proper Sterilizing Times and Temperatures*, Vol. 24, nº6, pp. 659- 661.
- Henkel, Sebastian G., et al. "Basic regulatory principles of *Escherichia coli*'s electron transport chain for varying oxygen conditions." *PLoS one* 9.9 (2014): e107640.
- Holdsworth, Donald, and Ricardo Simpson. "Kinetics of thermal processing." *Thermal processing of packaged foods* (2007): 87-122.
- Hong, Huynh A., et al. "*Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract." *Research in microbiology* 160.2 (2009): 134-143.

- Hunter KJ, Fletcher JM. The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2002; 3:399-406.
- Instituto Português de Acreditação. Retirado de < <http://www.ipac.pt/ipac/funcao.asp>>
- International Organization for Standardization, 2003. EN ISO 16140: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods, ISO, Geneva
- BIPM (Bureau International des Poids et Mesure). International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012. Retirado de <<https://www.bipm.org/en/home>>.
- ISO 17468:2016, Microbiology of the food chain – Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method.
- ISO 9001. (2015). Quality management systems – Requirements. International Organization for Standardization (ISO).
- ISO, EN. "IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories." *International Organization for Standardization and International Electrotechnical Commission* (2005).
- Jackson, John M., and Byron M. Shinn. *Fundamentals of food canning technology*. AVI Pub. Co., 1979.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005a). Chapter 3 - Intrinsic and Extrinsic Parameters of Foods That Affect Microbial Growth. In: *Modern Food Microbiology – Seventh Edition*. Springer Science+, Business media, 39-54.
- Jean, Delphine, Valerie Briolat, and Gilles Reysset. "Oxidative stress response in *Clostridium perfringens*." *Microbiology* 150.6 (2004): 1649-1659.
- Juven, B.J.; Ben-Shalom, N.; Weisslowicz, H. (June 1983). "Identification of chemical constituents of tomato juice which affect the heat resistance of *Lactobacillus fermentum*". *Journal of Applied Bacteriology*. 54, (3): 335-338.
- Kamboj, S., Gupta, N., Bandral, J. D., Gandotra, G., Anjum, N. (2020). Food safety and hygiene: A review. *Internacional Journal of Chemical Studies*, 8: 358-368.
- Kiu, Raymond, and Lindsay J. Hall. "An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*." *Emerging microbes & infections* 7.1 (2018): 1-15.
- Kobayashi, M., and Hayashi, S. (1998). "Supplementation of NaCl to starter culture of the soy yeast *Zygosaccharomyces rouxii*". *J. Ferment. Bioeng.* 85, 642-644.
- Kurtzman, Cletus P., Jack W. Fell, and Teun Boekhout, eds. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, 2011.
- Landry, W. L., Schwab, A. H., Lancette, G. A. (2001). BAM chapter 21 A: Examination of canned foods. U.S. Food and Drug Administration. Retirado de <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-21-a-examination-canned-foods>>
- Lindström M., Korkeala H., (April 2006). Laboratory diagnostics of botulism . *Clinical Microbiology Reviews*. 19 (2): 298-314.
- López Alonso, M., et al. "Toxic and trace elements in liver, kidney and meat from cattle slaughtered in Galicia (NW Spain)." *Food Additives & Contaminants* 17.6 (2000): 447-457.
- Luna, Ruth Ann, and Jane A. Foster. "Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression." *Current opinion in biotechnology* 32 (2015): 35-41.
- Machado, S. (2012). *Gestão da Qualidade*. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás (IFG-Inhumas). Brasil;
- Martorell, Patricia, et al. "Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments." *International journal of food microbiology* 114.2 (2007): 234-242.
- Mahler, Hellmut; Pasi, Aurelio; Kramer, John M.; Schulte, Petra; et al. (17 April 1997). "Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*". *The New England Journal of Medicine*. 336 (16): 1142-1148.
- Melo, Tauá Alves, et al. "Functional profile evaluation of *Lactobacillus fermentum* TCUESC01: a new potential probiotic strain isolated during cocoa fermentation." *BioMed research international* 2017 (2017).

- M. U. H. Joardder, M. Hasan Masud, "Food Preservation in Developing Countries: Challenges and solutions.", 3, pp.57-58, Springer Nature Switzerland AG 2019
- Muzembo, B. A., M. Iwai-Shimada, T. Isobe, K. Arisawa, M. Shima, T. Fukushima, and S. F. Nakayama. 2019. "Dioxins levels in human blood after implementation of measures against dioxin exposure in Japan. *Environmental Health and Preventive Medicine*". 24 (1):6.
- National Canners Association. *The Canning Industry: Its History, Importance, Organization, Methods, and the Public Service Values of Its Products*. Information Division, National Canners Association, 1963.
- Naghmouchi, Karim, et al. "Lactobacillus fermentum: A bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60.20 (2020): 3387-3399.
- Nicolopoulou-Stamati, Polyxeni, et al. "Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture." *Frontiers in public health* 4 (2016): 148.
- Noor, Asif, and Shailesh Khetarpal. "Anaerobic infections." (2018).
- Ohlhorst, S. D., et al. "Stover P, Konopka E. Nutrition research to affect food and a healthy life span. *Adv Nutr* 2013; 4: 579-84.
- Onami, S., Y.-M. Cho, T. Toyoda, J-i Akagi, S. Fujiwara, R. Ochiai, K. Tsujino, A. Nishikawa, and K. Ogawa. 2015. Orally administered glycidol and its fatty acid esters as well as 3-MCPD fatty acid esters are metabolized to 3-MCPD in the F344 rat. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 73 (3):726-731.
- Oomes, S. J. C. M., Van Zuijlen, A. C. M., Hehenkamp, J. O., Witsenboer, H., Van der Vossen, J. M. B. M., Brul, S. (2007). The characterisation of Bacillus spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 85-94.
- Oranuba, E., H. Deng, J. Peng, S. M. Dawsey, and F. Kamangar. 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons as a potential source of carcinogenicity of mate. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 37 (1): 26-41.
- Parkinson, N. G., Johnson, E. A., Ito, K. A. (2017). Chapter 19 – Botulism. In: Dodd, C. E. R., Aldsworth, T., Stein, R. A., Cliver, D. O., Riemann, H.P. *Foodborne Diseases* (Third edition), Academic Press, 381-393.
- Paul, Sulav Indra; Rahman, Md. Mahbubur; Salam, Mohammad Abdus; Khan, Md. Arifur Rahman; Islam, Md. Tofazzal (15 December 2021). "Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin's Island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile Aeromonas septicemia in Labeo rohita". *Aquaculture*. 545: 737156.
- Philip, P., Kern, D., Goldmanns, J. et al. Parallel substrate supply and pH stabilization for optimal screening of *E. coli* with the membrane-based fed-batch shake flask. *Microb Cell Fact* 17, 69 (2018).
- Piecková, E., Lehotská, R., Globanová, M. (2020). Heat resistant fungi, toxicity and their management by nanotechnologies. In: Rai, M., Abd-Elsaham, K. A. *Nanomycotoxicology - Treating Mycotoxins in the Nano Way*, Academic Press, 217-237.
- Potter N, Hotchkiss J. *Food Science*, 5th ed. New York: Chapman & Hall, 1995.
- Rather, I. A., W. Y. Koh, W. K. Paek, and J. Lim. 2017. The sources of chemical contaminants in food and their health implications. *Frontiers in Pharmacology* 8:830-830.
- Rault, Aline, Marielle Bouix, and Catherine Béal. "Fermentation pH influences the physiological-state dynamics of Lactobacillus bulgaricus CFL1 during pH-controlled culture." *Applied and environmental microbiology* 75.13 (2009): 4374-4381.
- Restaino, L., et al. "Growth characteristics of Saccharomyces rouxii isolated from chocolate syrup." *Applied and Environmental Microbiology* 45.5 (1983): 1614-1621.
- Rickman JC, Barrett DM, Bruhn CM. Review: nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables: part I. Vitamins C and B and phenolic compounds. *J Sci Food Agric*. 2007a; 87:930-944.

- Rickman JC, Bruhn CM, Barrett DM. Review: nutritional comparison of fresh, frozen, and canned fruits and vegetables: part II. Vitamin A and carotenoids, vitamin E, minerals and fiber. *J Sci Food Agric*. 2007b; 87:1185-1196.
- Robertson, Gordon L. "Packaging and food and beverage shelf life." *The Stability and Shelf Life of Food*. Woodhead Publishing, 2016. 77-106.
- Romano, P.; Suzzi, G. Higher Alcohol and Acetoin Production by *Zygosaccharomyces* Wine Yeasts. *J. Appl. Bacteriol*. 1993, 75, 541-545.
- CPD Online College, Sarah Wilkinson, 28 de setembro de 2020, Types of food Contamination. Retirado de <<https://cpdonline.co.uk/knowledge-base/food-hygiene/types-of-food-contamination/>>
- Schardl, Christopher L. "Introduction to the toxins special issue on ergot alkaloids." *Toxins* 7.10 (2015): 4232-4237.
- Steels, H.; James, S.A.; Roberts, I.N.; Stratford, M. *Zygosaccharomyces Lentus*: A Significant New Osmophilic, Preservative-Resistant Spoilage Yeast, Capable of Growth at Low Temperature. *J. Appl. Microbiol*. 1999, 87, 520-527.
- Silliker (2020). Procedimento relativo ao controlo da qualidade 33, Validação de métodos de análise microbiológica, 1-25.
- Silliker Portugal S. A., Mérieux NutriSciences. Retirado de ><https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal><
- Silva, N., Taniwaki, M. H., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Nascimento, M. S., Gomes, R. A. R. (2013). 23 - Commercial sterility. In: Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual, CRC Press, 311- 332.
- Sloan AE. The silent salesman. *Food Technol* 1996; 50(12): 25.
- Sorescu, Ionut & Dumitru, Mihaela & Ciurescu, Georgeta. (2019). Lactobacillus spp. and Enterococcus faecium strains isolation, identification, preservation and quantitative determinations from turkey gut content. ROMANIAN BIOTECHNOLOGICAL LETTERS. 24. 41-49.
- Thompson, L. A., and W. S. Darwish. 2019. Environmental chemical contaminants in food: Review of a global problem. *Journal of Toxicology* 2019:2345283-2345283.
- Tittlemier, S. A., D. Drul, M. Roscoe, D. Turnock, D. Taylor, and B. X. Fu. 2019. Fate of Ergot Alkaloids during laboratory scale durum processing and pasta production. *Toxins* 11 (4):195.
- Tulumoğlu, Şener, Halil İbrahim Kaya, and Ömer Şimşek. "Probiotic characteristics of Lactobacillus fermentum strains isolated from tulum cheese." *Anaerobe* 30 (2014): 120-125.
- U.S. Canned Foods Market Size, Share & Trends Analysis Report, By Type (Seafood, Vegetables, Meat Products, Fruits, Ready Meals), Competitive Landscape, And Segment Forecasts, 2018 - 2025, abril 2018. Retirado de <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/us-canned-foods-market>>
- Vaclavik, Vickie A., Elizabeth W. Christian, and Tad Campbell. *Essentials of food science*. Vol. 42. New York: Springer, 2008.
- World Health Organization. E. coli. Retirado de <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>>
- Will Kenton, 20 de novembro de 2020, International Organization for Standardization. Retirado de <<https://www.investopedia.com/terms/i/international-organization-for-standardization-iso.asp>>
- Wilks, Jessica C., and Joan L. Slonczewski. "pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry." *Journal of bacteriology* 189.15 (2007): 5601-5607.
- Wilson CA (1991), "Preserving food to preserve life: the response to glut and famine from early times to the end of the Middle Ages. In: Waste not, want not food preservation from early times to present day". Edinburgh University Press, Edinburgh, pp 5-31.
- Zolfaghari Emameh, R., S. Purmonen, A. Sukura, and S. Parkkila. 2018. Surveillance and diagnosis of zoonotic foodborne parasites. *Food Science & Nutrition* 6 (1):3-17.

Zheng, Jinshui, et al. "A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae." (2020).

Anexos

Anexo 1 - Fluxograma do princípio do método de estabilidade e esterilidade em conservas, de acordo com a NP 2309-2 e NP 4404-1

Estabilidade Conservas (NP 4404-1)
Esterilidade Conservas (NP 2309-2)

1- Prova de estabilidade: Exame externo da embalagem

Verificação do aspeto exterior da embalagem (normal, opada, frouxa)

2- Prova de estabilidade: Exame após incubação

Exame ao conteúdo (avaliação das características organoléticas: odor, aspeto, textura do produto).

3- Provas de esterilidade

Pesquisa de microrganismos mesófilos e termófilos

(Temperaturas 37 e 55°C) Conservas com pH≥4,5 e os seguintes produtos: tomate inteiro ou em pedaços, produtos acidificados ou adicionados de amido.	Meios líquidos	DTA
		Tioglicolato
	Meios sólidos	ADT
		ECL
PSA (para vegetais)		
(Temperaturas 37°C) Conservas com pH<4,5	Meios líquidos	DTA
		Tioglicolato
		MRS
	Meios sólidos	ADT
		ECL
		MRS
(Temperaturas 55°C) Conservas com pH<4,5	Meios líquidos	DTA
		Tioglicolato
	Meios sólidos	ADT
		ECL
		PSA

4- Prova de estabilidade:

Medição do valor do pH

5- Prova de estabilidade:

Em unidades que apresentem um odor e/ou aspeto suspeito ou uma variação de pH >0,3 e ≤ 0,5 unidades.

Anexo 2

Tabela 1: Parâmetros para a avaliação da estabilidade das amostras segundo a NP-4404-1:2002. O exame externo às embalagens não foi realizado para amostras contaminadas pois porções da matriz destas foi removida e colocado em frascos para contaminação. Estes frascos foram selados com parafina para simular as condições de anerobiose que seriam observadas nas latas. A capacidade de deformação destes frascos impede uma observação correta das alterações que seriam observadas numa lata comum devido.

Amostra		Exame externo à embalagem			Exame do conteúdo			Medição do pH					Estabilidade a 37°C	Estabilidade a 55°C
Amostra	Ensaio	25°C	37°C	55°C	25°C	37°C	55°C	25°C	37°C	55°C	Variação a 37°C	Variação a 55°C		
1	1	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,16	5,64	5,85	0,52	0,31	Não estável	Não estável
2	2	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,14	5,5	5,82	0,64	0,32	Não estável	Não estável
3	3	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,16	5,51	5,83	0,65	0,33	Não estável	Não estável
4	4	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,2	5,32	5,88	0,88	0,32	Não estável	Não estável
	5	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,27	5,43	5,90	0,84	0,37	Não estável	Não estável
5	6	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,31	5,29	5,97	1,02	0,34	Não estável	Não estável
	7	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,23	5,48	5,88	0,75	0,35	Não estável	Não estável
6	8	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,18	5,5	5,82	0,68	0,36	Não estável	Não estável
	9	-	-	-	-	C	N. A	6,21	5,41	5,9	0,8	0,31	Não estável	Não estável

7	10	C	C	C	-	C	N. A	4,45	4,43	4,42	0,02	0,03	Estável	Estável
	11	C	C	C	-	C	N. A	4,4	4,4	4,38	0	0,02	Estável	Estável
8	12	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	5,08	4,28	4,78	0,8	0,3	Não estável	Não estável
	13	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	5,08	4,51	4,76	0,57	0,32	Não estável	Não estável
9	14	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	5,09	4,36	4,77	0,73	0,32	Não estável	Não estável
	15	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	5,07	4,37	4,75	0,7	0,32	Não estável	Não estável
10	16	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	5,06	4,52	4,75	0,54	0,31	Não estável	Não estável
	17	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	5,07	4,29	4,69	0,78	0,38	Não estável	Não estável
11	18	C	C	C	-	C	N. A	4,85	4,73	4,72	0,12	0,13	Estável	Estável
12	19	C	C	C	-	C	N. A	6,01	5,95	5,95	0,06	0,06	Estável	Estável
	20	C	C	C	-	C	N. A	6,02	5,93	5,97	0,09	0,05	Estável	Estável
13	21	C	C	C	-	C	N. A	5,85	5,88	5,74	0,03	0,11	Estável	Estável
	22	C	C	C	-	C	N. A	5,88	5,86	5,78	0,02	0,1	Estável	Estável
14	23	C	C	C	-	C	N. A	6,28	6,17	6,12	0,11	0,16	Estável	Estável
	24	C	C	C	-	C	N. A	6,28	6,15	6,12	0,13	0,16	Estável	Estável
15	25	C	C	C	-	C	N. A	5,87	5,78	5,79	0,09	0,08	Estável	Estável
	26	C	C	C	-	C	N. A	5,88	5,79	5,8	0,09	0,08	Estável	Estável
16	27	C	C	C	-	C	N. A	5,89	5,87	5,76	0,02	0,13	Estável	Estável
	28	C	C	C	-	C	N. A	5,87	5,87	5,79	0	0,08	Estável	Estável
17	29	C	C	C	-	C	N. A	5,81	5,76	5,77	0,05	0,04	Estável	Estável
18	30	C	C	C	-	C	N. A	4,85	4,73	4,72	0,12	0,13	Estável	Estável
	31	C	C	C	-	C	N. A	4,86	4,76	4,70	0,1	0,16	Estável	Estável

19	32	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,11	5,63	5,80	0,48	0,31	Não estável	Não estável
	33	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,13	5,6	5,81	0,53	0,32	Não estável	Não estável
20	34	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,34	5,47	5,96	0,87	0,38	Não estável	Não estável
	35	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,3	5,39	5,99	0,91	0,31	Não estável	Não estável
21	36	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	5,62	4,98	5,29	0,64	0,33	Não estável	Não estável
	37	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	5,6	4,95	5,26	0,65	0,34	Não estável	Não estável
22	38	C	C	C	-	C	N. A	4,1	4,07	4,08	0,03	0,02	Estável	Estável
23	39	C	C	C	-	C	N. A	4,16	4,07	4,13	0,09	0,03	Estável	Estável
24	40	C	C	C	-	C	N. A	4,12	4,11	4,11	0,01	0,01	Estável	Estável
25	41	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	3,72	3,31	3,49	0,41	0,23	Não estável	Não estável
	42	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	3,7	3,26	3,49	0,44	0,21	Não estável	Não estável
26	43	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	3,84	3,39	3,6	0,45	0,24	Não estável	Não estável
	44	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	3,8	3,43	3,54	0,37	0,26	Não estável	Não estável
27	45	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	4,6	3,69	4,25	0,91	0,35	Não estável	Não estável
	46	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	4,48	3,59	4,16	0,89	0,32	Não estável	Não estável
28	47	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,49	5,1	6,29	1,39	0,2	Não estável	Não estável
	48	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,5	5,42	6,25	1,08	0,25	Não estável	Não estável
29	49	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	3,58	2,99	3,34	0,59	0,24	Não estável	Não estável

	50	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	3,6	3	3,28	0,6	0,32	Não estável	Não estável
30	51	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	5,97	5,05	5,75	0,92	0,22	Não estável	Não estável
	52	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	5,94	5,1	5,71	0,84	0,23	Não estável	Não estável
31	53	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,4	5,68	6,16	0,72	0,24	Não estável	Não estável
32	54	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,38	5,32	6,1	1,06	0,28	Não estável	Não estável
33	55	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,32	5,4	6,18	0,92	0,14	Não estável	Não estável
	56	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	6,3	5,34	6,12	0,96	0,18	Não estável	Não estável
34	57	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	4,44	3,69	4,27	0,75	0,17	Não estável	Não estável
	58	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	4,45	3,73	4,3	0,72	0,15	Não estável	Não estável
35	59	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	3,22	2,86	2,99	0,36	0,23	Não estável	Não estável
	60	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	3,22	2,9	3,01	0,32	0,21	Não estável	Não estável
36	61	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	5,96	5,09	5,71	0,87	0,25	Não estável	Não estável
	62	-	-	-	-	N. C. (odor e aspeto)	N. A	5,92	5,01	5,69	0,91	0,23	Não estável	Não estável
37	63	C	C	C	-	C	N. A	6,26	6,18	6,16	0,08	0,1	Estável	Estável
38	64	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	6,11	5,45	5,78	0,66	0,33	Não estável	Não estável
39	65	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	6,44	5,21	5,26	1,23	1,18	Não estável	Não estável
40	66	-	-	-	-	N. C. (aspeto)	N. A	6,03	5,26	5,29	0,77	0,74	Não estável	Não estável

Anexo 3

Tabela 1: Resultados dos parâmetros do método para avaliação da esterilidade como definido na NP-2309-2: 1988. Encontram-se os diferentes meios utilizados durante este procedimento juntamente com o número de resultados positivos no número de placas ou tubos utilizados. Estes resultados correspondem aos obtidos antes da repicagem para novos meios.

Amostra	Ensaio	Desenvolvimento a 37°C									Desenvolvimento a 55°C					
		Tio	DTA	ECL	ADT	PSA	MRS Broth	MRS agar	CRB	Thermo. Agar	Tio	DTA	ECL	ADT	PSA	Thermo. Agar
1	1	3/3	2/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
2	2	3/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
3	3	3/3	1/3	3/3	1/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
4	4	3/3	2/3	3/3	1/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
	5	3/3	0/3	3/3	0/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
5	6	3/3	1/3	2/3	1/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
	7	3/3	1/3	3/3	2/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
6	8	3/3	3/3	3/3	0/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
	9	3/3	2/3	3/3	1/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
7	10	0/3	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3		0/3
	11	0/3	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3		0/3
8	12	2/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
	13	3/3	3/3	3/3	2/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
9	14	3/3	2/3	2/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
	15	3/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
10	16	3/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
	17	3/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
11	18	0/3	0/3	0/3	0/3						0/3	0/3	0/3	0/3		
12	19	0/3	0/3	0/3	0/3						0/3	0/3	0/3	0/3		

	20	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
13	21	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
	22	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
	23	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
14	24	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
	25	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
15	26	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
	27	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
16	28	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
	29	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
17	30	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
18	31	0/3	0/3	0/3	0/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
	32	2/3	3/3	3/3	1/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
19	33	3/3	2/3	3/3	2/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
	34	3/3	2/3	3/3	3/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
20	35	3/3	2/3	3/3	3/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
	36	3/3	1/3	3/3	1/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
21	37	3/3	1/3	3/3	1/3					0/3	0/3	0/3	0/3		
	38	0/3	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	0/3	
22	39	0/3	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	0/3	
23	40	0/3	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	0/3	
24	41	3/3	3/3	3/3	2/3		3/3	3/3	0/3		0/3	0/3	0/3	0/3	
25	42	3/3	3/3	3/3	1/3		3/3	3/3	0/3		0/3	0/3	0/3	0/3	
	43	3/3	3/3	2/3	2/3		3/3	3/3	0/3		0/3	0/3	0/3	0/3	
26	44	3/3	3/3	3/3	3/3		3/3	3/3	0/3		0/3	0/3	0/3	0/3	
	45	3/3	3/3	3/3	3/3		3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
27	46	3/3	3/3	3/3	3/3		3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	47	3/3	3/3	3/3	2/3					0/3	0/3	0/3	0/3		

	48	3/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3	
29	49	3/3	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	5/5		0/3	0/3	0/3	0/3	
	50	3/3	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	5/5		0/3	0/3	0/3	0/3	
30	51	3/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3	
	52	3/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3	
31	53	2/3	2/3	3/3	1/3						0/3	0/3	0/3	0/3	
32	54	3/3	2/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3	
33	55	3/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3	
	56	3/3	2/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3	
34	57	3/3	3/3	2/3	3/3		3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	58	3/3	3/3	3/3	3/3		3/3	3/3	0/3	0/3	1/3	2/3	1/3	0/3	0/3
35	59	2/3	3/3	3/3	3/3		3/3	3/3	0/3		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	60	3/3	3/3	3/3	3/3		3/3	3/3	0/3		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
36	61	3/3	3/3	3/3	3/3						1/3	1/3	0/3	0/3	
	62	2/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3	
37	63	0/3	0/3	0/3	0/3						0/3	0/3	0/3	0/3	
38	64	3/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3	
39	65	3/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3	
40	66	3/3	3/3	3/3	3/3						0/3	0/3	0/3	0/3	

Tabela 2: Resultados dos parâmetros do método para avaliação da esterilidade como definido na NP-2309-2: 1988. Encontram-se os diferentes meios utilizados durante este procedimento juntamente com o número de resultados positivos no número de placas ou tubos utilizados. Estes resultados correspondem aos obtidos após repicagem.

Amostra	Ensaio	Desenvolvimento a 37°C				Desenvolvimento a 55°C			Resultado 37°C	Resultado 55°C
		ADT (DTA)	ADT (Tio)	ECL (Tio)	MRS agar (MRS broth)	ADT (DTA)	ADT (Tio)	ECL (Tio)		
1	1	2/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
2	2	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
3	3	1/3	1/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
4	4	1/3	2/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	5	2/3	2/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
5	6	2/3	0/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	7	1/3	2/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
6	8	1/3	1/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	9	3/3	1/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
7	10	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
	11	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
8	12	3/3	2/3	2/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	13	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
9	14	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	15	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
10	16	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	17	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
11	18	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
12	19	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
	20	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril

13	21	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
	22	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
14	23	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
	24	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
15	25	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
	26	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
16	27	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
	28	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
17	29	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
18	30	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
	31	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
19	32	3/3	2/3	2/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
	33	1/3	2/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
20	34	2/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
	35	1/3	2/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
21	36	0/3	1/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
	37	1/3	2/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
22	38	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
23	39	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
24	40	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
25	41	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	42	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
26	43	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	44	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
27	45	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	46	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
28	47	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	48	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril

29	49	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	50	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
30	51	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	52	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
31	53	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
32	54	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
33	55	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	56	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
34	57	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	1/3	Não estéril	Não estéril
	58	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
35	59	3/3	2/3	2/3	3/3	0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	60	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
36	61	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
	62	3/3	2/3	2/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
37	63	0/3	0/3	0/3		0/3	0/3	0/3	Estéril	Estéril
38	64	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
39	65	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril
40	66	3/3	3/3	3/3		0/3	0/3	0/3	Não estéril	Não estéril