



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**

# **ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE PSICROTRÓFICOS AERÓBIOS E DE *ENTEROBACTERIACEAE* NA SOBREVIVÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* 1/2a E 4b EM SALADAS MINIMAMENTE PROCESSADAS**

**Andreia Filipa de Mendonça Dias Cavaco**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Professora Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira

Co-orientador: Dra. Maria Isabel Santos

## **Júri:**

Presidente - Doutor Virgílio Borges Loureiro, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Vogais - Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

- Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Licenciada Maria Isabel da Silva Santos, na qualidade de especialista.

Lisboa, 2009

*À minha mãe e ao meu irmão*

## Agradecimentos

- À minha orientadora, Professora Maria Adélia Ferreira, por toda a atenção dispensada, conhecimentos transmitidos, inteira disponibilidade e pelo carinho e amizade sempre demonstrados.
- À minha co-orientadora, Dra. Maria Isabel Santos, por todo o apoio prestado e orientação durante o decorrer do estágio, conhecimentos transmitidos e pela amizade e carinho sempre demonstrados.
- A todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Instituto de Saúde Pública Dr. Ricardo Jorge, Dra. Maria do Rosário Novais, Rosália Furtado, Eng. Carla Maia, Eng. Cristina Correia, Isilda Ferreira, Loreto Campos, Madalena Ferreira, Helena Marques, Nuno Rosa e Fernanda Oliveira, por toda o apoio prestado durante o decorrer do estágio.
- À Engenheira Ana Carla Silva, por toda a ajuda e disponibilidade durante a realização deste trabalho.
- À Professora Suzana Ferreira Dias, pela ajuda no tratamento estatístico dos resultados.
- Ao professor José Manuel Gouveia, à Eng. Paula Vasconcelos e a todos os funcionários do Laboratório de Estudos Técnicos do Instituto Superior de Agronomia, pela ajuda na realização da prova de análise sensorial.
- Aos meus colegas e amigos Pedro Oliveira, Maria José Santos e Maria Inês Gonçalves, por toda a ajuda na realização deste trabalho.
- À Patricia e Teresa Heitor, por todo o apoio e amizade ao longo de todos os anos de curso.

## Resumo

Os vegetais no estado natural são susceptíveis de deterioração. O consumo de produtos vegetais contendo apenas ingredientes naturais e prontos-a-comer tem aumentado. O objectivo desta tese foi estudar a evolução do crescimento de *Listeria monocytogenes* em amostras de saladas minimamente processadas em venda nos supermercados Portugueses.

Para avaliar a presença e concentração de psicrotróficos, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, foram realizadas análises microbiológicas clássicas. Utilizou-se o método *Enzyme-linked Fluorescent Assay* para detectar a presença de *Salmonella* spp., *E. coli* O157 H7 e *L. monocytogenes*.

A contaminação média obtida foi de  $2,44 \times 10^7$  ufc/g para psicrotróficos e  $2,28 \times 10^6$  ufc/g para *Enterobacteriaceae*. A presença de *L. monocytogenes* foi detectada apenas numa salada, indicando uma taxa de contaminação de 1,5 %. Simulando condições, avaliou-se o risco potencial do seu crescimento em 27 amostras inoculadas com os serovares 1/2a e 4b, até ao fim do prazo de validade. Para avaliar alterações sensoriais durante este período, foram realizadas provas organolépticas pareadas.

As amostras de saladas estudadas não suportam o crescimento de *L. monocytogenes* e este facto não depende do consórcio microbiano presente. A análise sensorial indicou alterações organolépticas sensíveis.

**Palavras-chave:** Saladas minimamente processadas, microrganismos patogénicos, análises microbiológicas, ELFA.

## Abstract

### STUDY THE INFLUENCE OF AEROBICS PSYCHROTROPHS AND ENTEROBACTERIACEAE IN LISTERIA MONOCYTOGENES 1/2a and 4b SURVIVAL ON MINIMAL PROCESSED SALADS

Vegetables natural state is susceptible of spoilage. Search for products that contain natural ingredients and are ready-to-eat has increased. The aim of this thesis was to study the growth/survival of *Listeria monocytogenes* in samples of minimally processed salads from Portuguese supermarkets.

To evaluate the presence and concentration of psychrotrophs, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* and *L. monocytogenes*, classic microbiological analysis was carried. But Enzyme-linked Fluorescent Assay was used to detect *Salmonella* spp., *E. coli* O157H7 and *L. monocytogenes*.

The average contamination of salad was of  $2,44 \times 10^7$  ufc/g psychrotrophs and  $2,28 \times 10^6$  ufc/g *Enterobacteriaceae*. *Listeria monocytogenes* was detected in one salad corresponding to 1,5 % contamination. Simulating conditions, its growth potential risk was evaluated in twenty seven samples, spiked with serovares 1/2a and 4b, by counts until the sell-by-date. To evaluate the sensorial alterations undergone, organoleptic tests were performed by a taste panel.

Salad samples studied do not support the growth of *L. monocytogenes* and this fact seems not to related with the number and consortium of the native micro flora found. Results of the sensorial analysis had indicated the occurrence of sensible organoleptic alterations during the period of storage.

**Keywords:** Minimally processed salads, pathogenic microorganisms, microbiological analyses, ELFA.

## Extended Abstract

### STUDY THE INFLUENCE OF AEROBICS PSYCHROTROPHS AND ENTEROBACTERIACEAE IN LISTERIA MONOCYTOGENES 1/2a and 4b SURVIVAL ON MINIMAL PROCESSED SALADS

All vegetables in their natural state are susceptible to spoilage by microorganisms at a rate that depends on various intrinsic and extrinsic factors. Consumers are increasingly demanding for convenient ready-to-eat vegetables and with fresh like quality, containing only natural ingredients.

Plant tissues themselves, even having been contaminated by undesirable microorganisms, represent a well-defined ecosystem, and therefore different preservation methods should be use to guarantee their stability and safety as a food. Additionally, decontamination procedures to reduce the initial microbial load of raw material and methods to avoid post-process contamination change the original micro flora of the ecosystem, affecting the kind of microbial consortium that can be established afterwards.

Ready-to-eat vegetables retain much of their native indigenous flora after minimal processing and some pathogens may form part of this micro flora, posing a potential safety problem. *Listeria monocytogenes* is a micro organism widely distributed on plant vegetation. Plants and plant parts used as vegetable salads play a key role in disseminating pathogens from natural habits into the human food supply chain. *L. monocytogenes* is a psychrotropic organism, capable of growing at refrigeration temperatures, and it is also a facultative anaerobe, therefore, capable of survival/growth under low O<sub>2</sub> concentrations present in modified-atmosphere packaged vegetables. By screening out these characteristics, we are able to study the micro organism growth, obtaining important understanding of salads conditions and sanity state, necessary to produce data for predictive models elaboration.

This thesis main objective was to i) study the growth development of spiked *L. monocytogenes* in minimally processed salads, through the simulation of their storage conditions in consumer's fridges and to ii) understand how the native micro flora present has an influence in its growth. Thus, to control both presence and concentration of some microorganisms in these salads, simple microbiological analysis were performed for psychrotrophs, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*,

*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *L. monocytogenes*. To evaluate the presence in this product of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *E. Coli* O157 H7, the Enzyme-linked Fluorescent Assay method (ELFA) was used. Sixty seven samples of salad, consisting mostly in leafy vegetables, belonging to 3 different brands and 7 different

varieties marketed in Portuguese supermarkets, were analysed. To evaluate the growth potential of *L. monocytogenes*, 27 selected samples were inoculated with two *Listeria* serovars, 1/2a and 4b. The number of cells/g present in the day of inoculation and in the last sell-by-date day were determined and compared.

A taste panel laboratory evaluation to know the salad's sensorial changes during this period was realized by paired organoleptic tests, to assess the changes dimension that reaches the consumer at the end.

The psychrotrophs and *Enterobacteriaceae* average contamination levels were, respectively per gram of salad,  $2,44 \times 10^7$  and  $2,28 \times 10^6$ . These values indicate a high hygienic contamination, which recommends attention by the process manager of these products, for safety and as well for quality assurance reasons. On top of this, was found that native contamination by *Listeria monocytogenes* was present but only in one of the screened samples (1, 5 %). Despite this, it was verified that the growth of spiked serovars of *L. monocytogenes*, was not supported by the salads assayed and the numbers of native micro flora present, seemed to have no relationship with this fact. Nevertheless, the results of sensorial analysis showed that organoleptic differences occurred during the storage period.

# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract.....	iii
Extended Abstract.....	iv
Índice .....	iv
Índice de figuras.....	iii
Índice de Quadros.....	iv
Lista de Abreviaturas .....	iii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	5
2.1 – Saladas Minimamente Processadas.....	5
2.1.1. Principais operações unitárias dos Vegetais Minimamente Processados .....	6
2.1.1.1. - Operações de separação e selecção.....	7
2.1.1.2. - Limpeza, lavagem e descontaminação.....	7
2.1.1.3. - Operação de redução de dimensão – Corte .....	8
2.1.2 -Métodos de conservação de produtos hortícolas refrigerados minimamente processados.....	8
2.1.3. - Aspectos microbiológicos e enzimáticos de alteração dos vegetais minimamente processados.....	8
2.1.4 - Composição da atmosfera interna das embalagens .....	9
2.1.5 - Conservação pelo frio .....	9
2.1.6 - Embalagem.....	9
2.2 – Ecologia microbiana das saladas minimamente processadas .....	10
2.3 – <i>Listeria monocytogenes</i> .....	11
2.3.1 – <i>Listeria monocytogenes</i> em saladas minimamente processadas.....	13
2.3.1.1 – Influência da microflora no crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	14
2.4 – Listeriose, surtos alimentares .....	15
2.5 – Análise Sensorial.....	16
3 – Materiais e Métodos.....	19
3.1 - Estirpes microbianas .....	19
3.2 – Amostras de saladas.....	19
3.3 – Meios e reagentes.....	20

3.3.1 – Meios utilizados na contagem de microrganismos psicotróficos aeróbios totais .....	20
3.3.2 – Meios utilizados na contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	20
3.3.3 – Meios utilizados na contagem de <i>Escherichia coli</i> .....	21
3.3.4 – Meios utilizados na contagem de <i>Listeria</i> spp. ....	21
3.3.5 – Meios utilizados na contagem de <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	22
3.3.6 – Meios utilizados na contagem de <i>Clostridium perfringens</i> .....	23
3.3.7 – Meios utilizados na contagem e pesquisa de <i>Bacillus cereus</i> .....	23
3.3.8 – Meios utilizados como diluentes .....	24
3.3.9 – Meios utilizados na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	24
3.3.10 – Meios utilizados na pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	26
3.3.11 – Meios utilizados na pesquisa de <i>Escherichia coli</i> O157 .....	26
3.3.12 – “Kit” utilizado na pesquisa da toxina diarreica de <i>Bacillus cereus</i> .....	27
3.3.13 – Reagentes e “kits” para identificação bioquímica .....	27
3.3.14 – Meios utilizados para preparação do inoculo de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	29
3.4 – Métodos utilizados nas análises microbiológicas .....	29
3.4.1 – Transporte e recepção das amostras .....	30
3.4.2 – Método utilizado na colheita das tomas de amostras .....	30
3.4.3 – Método utilizado na diluição de tomas de amostras .....	31
3.4.4 – Métodos utilizados na pesquisa e contagem de microrganismos psicotróficos, <i>Enterobacteriaceae</i> e patogênicos .....	32
3.4.4.1 – Método utilizado na preparação das diluições decimais .....	34
3.4.4.2 – Método utilizado na contagem de microrganismos psicotróficos .....	34
3.4.4.3 – Métodos utilizados na contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	35
3.4.4.4 – Método utilizado na contagem de <i>Escherichia coli</i> .....	35
3.4.4.5 – Métodos usados na contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	35
3.4.4.6 – Métodos utilizados na contagem de <i>Clostridium perfringens</i> .....	36
3.4.4.7 – Métodos utilizados na contagem de <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	36
3.4.4.8 – Métodos utilizados na contagem e pesquisa de <i>Bacillus cereus</i> .....	37
3.4.4.9 – Métodos utilizados na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp., de <i>Listeria monocytogenes</i> e de <i>Escherichia coli</i> O157 .....	37
3.4.4.9.1 – Método utilizado na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	38
3.4.4.9.2 – Método utilizado na pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	39
3.4.4.9.3 – Método utilizado na pesquisa de <i>Escherichia coli</i> O157 .....	39
3.4.4.10 – Método utilizado na pesquisa da toxina diarreica de <i>Bacillus cereus</i> ....	41
3.5 – Contaminação das saladas com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	41

3.5.1 - Preparação e determinação do inoculo a utilizar com <i>Listeria monocytogenes</i>	41
3.5.2 – Objectivo da contaminação	43
3.6 – Análise sensorial	44
3.7 – Análise de dados e tratamento estatístico	45
3.7.1 – Análises microbiológicas	45
3.7.2 – Análises sensoriais	45
4 - Resultados	46
4.1 – Resultados da análise microbiológica	46
4.1.1 – Contagem de psicrotróficos aeróbios totais e <i>Enterobacteriaceae</i>	46
4.1.2 – Contagem de <i>Escherichia coli</i>	50
4.1.3 – Contagem de <i>Listeria</i> spp.	50
4.1.4 – Contagem de <i>Aeromonas hydrophila</i>	51
4.1.5 – Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	51
4.1.6 – Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	51
4.1.7 – Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp., de <i>Listeria monocytogenes</i> e de <i>Escherichia coli</i> O157 H7	52
4.2 – Resultados da contaminação de saladas com <i>Listeria monocytogenes</i>	53
4.3 - Resultados da Análise Sensorial	56
5 - Discussão de resultados	58
5.1 - Discussão de resultados da Análise Microbiológica	58
5.1.1 – Discussão de resultados das contagens de psicrotróficos aeróbios totais e <i>Enterobacteriaceae</i>	58
5.1.2 – Discussão de resultados das contagens de <i>Escherichia coli</i>	60
5.1.3 – Discussão de resultados das contagens de <i>Listeria</i> spp.	60
5.1.4 – Discussão de resultados das contagens de <i>Aeromonas hydrophila</i>	60
5.1.5 – Discussão de resultados das contagens de <i>Bacillus cereus</i>	60
5.1.6 – Discussão dos resultados da pesquisa de <i>Salmonella</i> spp., de <i>Listeria monocytogenes</i> e de <i>Escherichia coli</i> O157 H7	61
5.2 – Discussão de resultados da contaminação de saladas com <i>Listeria monocytogenes</i>	61
5.3 - Discussão de resultados da Análise Sensorial	63
6 - Conclusões	64
7 - Referências bibliográficas	65
8 – Cybergrafia citada e consultada	71

## Índice de figuras

20

<b>Figura 2</b> – Colónias características de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	20
<b>Figura 3</b> – Colónias características de <i>Escherichia coli</i> .....	21
<b>Figura 4</b> – Colónias características de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio ALOA .....	22
<b>Figura 5</b> - Colónias características de <i>Clostridium perfringens</i> .....	233
<b>Figura 6</b> – Colônia característica de <i>Bacillus cereus</i> em meio Mossel.....	24
<b>Figura 7</b> – API Listeria com perfil da espécie <i>L. monocytogenes</i> .....	28
<b>Figura 8</b> – Operação de toma de amostras para realização dos ensaios .....	31
<b>Figura 9</b> – Diluidor automático com balança.....	32
<b>Figura 11</b> – Esquema de diluições sucessivas .....	34
<b>Figura 12</b> - Aparelho mini-VIDAS .....	38
<b>Figura 13</b> - Barrete e cone mini-VIDAS.....	37
<b>Figura 14</b> – Contaminação das saladas em câmara de fluxo laminar .....	44
<b>Figura 15</b> – Carga microbiana de psicotróficos aeróbios totais e de <i>Enterobacteriaceae</i> ..	48
<b>Figura 16</b> – Diagramas de Extremos e Quartis do logaritmo das contagens de a) psicotróficos e b) <i>Enterobacteriaceae</i> .....	48
<b>Figura 17</b> – Relação entre a presença de psicotróficos e <i>Enterobacteriaceae</i> .....	50
<b>Figura 18</b> – Número de saladas contaminadas com <i>B. cereus</i> por marca e variedade.....	51
<b>Figura 19</b> – Resultados da pesquisa de toxina diarreica de <i>B. cereus</i> .....	52
<b>Figura 20</b> – Relação entre o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a e 4b.....	54
<b>Figura 21</b> – Relação entre a presença de psicotróficos e o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> estirpe 1/2a .....	55
<b>Figura 22</b> - Relação entre a presença de psicotróficos e o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> estirpe 4b .....	55
<b>Figura 23</b> - Relação entre a presença de <i>Enterobacteriaceae</i> e o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> estirpe 1/2a .....	56
<b>Figura 24</b> - Relação entre a presença de <i>Enterobacteriaceae</i> e o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> estirpe 4b .....	56

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1</b> – Ingredientes e composição das amostras de saladas.....	19
<b>Quadro 2</b> – Distribuição do número de amostras por marca e variedade de salada .....	19
<b>Quadro 3</b> – Peso das tomas das amostras de acordo com o ensaio a efectuar .....	31
<b>Quadro 4</b> – Ensaios realizados para avaliação microbiológica .....	33
<b>Quadro 5</b> – Testes bioquímicos de diagnóstico para identificação de <i>A. hydrophila</i> .....	37
<b>Quadro 6</b> - Contagens de <i>L. monocytogenes</i> em RAPID>Listeria spp. (i) e COH (ii) .....	42
<b>Quadro 7</b> – Contagem de microrganismos psicrótróficos aeróbios totais e de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	47
<b>Quadro 8</b> – Resultados das pesquisas realizadas no aparelho mini-VIDAS .....	52
<b>Quadro 9</b> – Resultados do crescimento das duas estirpes de <i>L. monocytogenes</i> e respectivo valor médio .....	53

## Lista de Abreviaturas

**AMB** – Aeromonas Medium Base  
**AMP** – Alimentos minimamente processados  
**BCA** – *Bacillus cereus* Agar  
**BCET-RPLA** - *Bacillus cereus* enterotoxin - Reversed Passive Latex Agglutination  
**BHI** – Brain Heart Infusion  
**BPW** – Buffered Peptone Water  
**cF-d** – Caldo Fraser demi  
**CT** – Cefixima -Telurito  
**ECDC** - European Centre for disease prevention and control  
**EFSA** – European Food Safety Authority  
**ELFA** - Enzyme Linked Fluorescent Assay  
**DTA** – Doenças transmitidas por alimentos  
**FAO** – Food and Agriculture organization  
**HPA** – Health Protection Agency  
**IMS** – Separação imuno-magnética  
**LSD** - Least Significance Differences  
**MCK** – Caldo MacConkey  
**MKTTn-T** – Caldo Muller-Kauffman Tetrionato  
**MP** – Minimamente processados

**mTSB** – Caldo Trypticase Soja modified  
**N** - Novobiocina  
**NCTC** – National Collection of Type Cultures  
**PCA** – Plate Count Agar  
**PCR** – Polymerase Chain Reaction  
**PME** - Pectinametilsterase  
**PPO** – Polifenoloxidase  
**PGs** - Poligalacturonase  
**PIPLC** - Phosphatidylinositol-specific phospholipase C  
**POs** - Peroxidases  
**RVS-T** – caldo Rappaport Vassiliadis Soja  
**SM2** - Gelose chroID™ Salmonella  
**TBX** – Tryptone Byle X-Glucoronide  
**TS** – Triptona Sal  
**TSA** – Tryptone Soya Agar  
**TSI** – Triple Sugar Iron  
**TSC** - Tryptone Sulfite Cycloserine  
**VP** - Voges-Proskauer  
**VRBG** – Violet Red Bile Glucose  
**WHO** – World health organization  
**XLD** - Xylose-Lysine-Desoxycho

## 1. Introdução

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são provavelmente o problema de saúde mais evidente no mundo contemporâneo, devido à emergência de novos microrganismos patogénicos, à re-emergência de outros e ao desenvolvimento de novos produtos alimentícios. A incidência das DTA tem aumentado, de forma considerável, devido a factores que incluem a mudança do estilo de vida da população (Fröder, 2005). Os perigos para a saúde humana que decorrem da ingestão de alimentos, devido a contaminações diversas ou resultantes do contacto com ambientes insalubres, constituem actualmente um vasto campo de preocupações. Os graves surtos de toxinfecções que têm surgido nos últimos anos, nos países ocidentais, sanitariamente mais evoluídos, originados pela presença de microrganismos patogénicos nos alimentos desencadearam reacções nalguns sectores da opinião pública, da qual resulta a necessidade de se reequacionar permanentemente a problemática da segurança alimentar.

O papel cada vez mais integrante da mulher na vida activa implica um menor dispêndio de tempo na preparação de refeições e portanto uma maior tendência ao consumo de alimentos preparados, tais como alimentos crus ou minimamente processados (AMP). Por outro lado, o crescente envelhecimento da população e o aumento considerável de imunocomprometidos, faz com que o número de pessoas susceptíveis a este tipo de doenças seja cada vez maior.

Um dos grupos de alimentos que têm ganho mercado, devido a questões como a conveniência de consumo são os vegetais folhosos minimamente processados (Alzamora et al., 2000)

Epidemiologicamente, um dos primeiros grandes surtos alimentares causados por *L. monocytogenes* foi relacionado com vegetais. Em 1981, no Canadá, ocorreram 41 casos, envolvendo 7 adultos e 34 crianças, e o alimento responsável foi salada de repolho e cenoura tipo “coleslaw”, contaminada por *L. monocytogenes* do serótipo 4b. Das pessoas envolvidas, 15 crianças (44%) e 2 adultos (29 %) morreram, sendo a taxa de mortalidade de 41% (Bechaut, 2002).

Estão estudados e referidos inúmeros casos e surtos de listeriose humana e animal em todo o mundo, mas particularmente na Europa e América do Norte. Entre 1975 e

1978 registaram-se em Angers, 186 casos de listeriose humana posteriormente confirmados como pertencentes ao mesmo surto epidémico, dos quais resultaram várias mortes. No Canadá foram notificados 81 casos durante o ano de 1981. Em Boston, de Julho a Agosto de 1983, uma epidemia atingiu 49 pessoas, tendo todas em comum a ingestão de um determinado tipo de leite refrigerado. Em 1985, em Los Angeles, 142 pessoas foram atingidas por uma infecção por *L. monocytogenes* do serótipo 4b veiculada por queijos refrigerados. Na Grã-bretanha, nos meados da década de 80 registaram-se 475 casos de listeriose. Em 1985, ocorreu um surto nos USA desencadeado por queijo de pasta mole, no qual se registaram 60 mortos entre 230 pessoas atingidas. Entre 1990 e 1995, registaram-se diversos surtos associados a patês (Austrália), mexilhão (Nova Zelândia) e em França ocorreram uma série de surtos graves devidos a carnes e lacticínios, dos quais resultaram cerca de 90 mortos, 22 abortos e mais de 300 pessoas atingidas. Todos estes surtos e outros ainda mais recentes têm em comum a ingestão de alimentos conservados no frio, a maioria em produtos lácticos, sendo também assinalados alguns devido ao consumo de vegetais mantidos refrigerados. Nos animais estão referidas situações de listeriose veiculadas por silagens (Filipe, 2005).

Em Portugal a listeriose não é uma doença de declaração obrigatória, assim os dados existentes traduzem uma realidade subavaliada, pois a maior parte dos casos relativos a esta doença não são reportados. Pintado *et al.*, (2005), reportaram nesse ano uma incidência de 5 casos de listeriose por milhão de habitantes, sendo este valor nitidamente mais baixo que a incidência real.

Segundo dados presentes no 8º Relatório da *World Health Organization* (WHO), 2000 – “Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe”, foram notificados em Portugal um total de 42 surtos associados à ingestão de alimentos contaminados, afectando 666 indivíduos, no ano de 1999, dos quais 8 surtos e 142 pessoas estiveram associadas ao consumo de alimentos prontos a comer. No ano de 2000, foram notificados 17 surtos de origem alimentar, dos quais 5 estiveram associados igualmente com alimentos prontos a consumir, afectando um total de 53 pessoas da totalidade das 140 afectadas. Os dados fornecidos neste relatório indicam-nos que 2,4 % e 0 % dos surtos acima mencionados, correspondentes a 1999 e 2000, respectivamente, estão associados a alimentos embalados e que 11,9 % e 11,8 % estão associados à ingestão de alimentos crus.

Segundo dados presentes no relatório da *European Food Safety Authority* em colaboração com o *European Centre for Disease Prevention and Control* (EFSA/ECDC)

(2007), em Portugal, só foram reportados 38 casos de listeriose humana em 2004. Este mesmo relatório reporta, dados qualitativos relativos à pesquisa de *L. monocytogenes*, estando os resultados para saladas e vegetais situados num intervalo de 0 – 16,7 %, no ano de 2006 e sendo estes dados relativos a 10 países da União Europeia (UE).

Em relação à presença de *Listeria* spp. ou *L. monocytogenes* em vegetais “in natura” e MP ou prontos para o consumo, há uma grande variação nos resultados publicados.

Odumeru *et al.* (1997), no Canadá, analisaram amostras de vegetais não processados e de vegetais prontos para consumo processados e constataram uma frequência de 6,1% de *L. monocytogenes* nos produtos minimamente processados.

Nørrung *et al.* (1999), na Dinamarca, examinaram 350 amostras de rebentos e de vegetais cortados e constataram uma alta ocorrência de *L. monocytogenes*. Segundo os limites estabelecidos naquele país, populações de *L. monocytogenes* entre 10 e 100 ufc/g são consideradas insatisfatórias e superiores a 100 ufc/g não são aceitáveis. Das amostras analisadas, 23% estavam em condições insatisfatórias.

Em Portugal, Guerra *et al.* (2001) analisaram 37 amostras de frutas e hortaliças prontas para o consumo e de hortaliças “in natura”, e não encontraram *L. monocytogenes* nas amostras.

Outro estudo com resultados semelhantes foi realizado no Canadá por Farber *et al.* (1989). Não encontraram *Listeria* spp. em 110 amostras de vegetais “in natura”, incluindo alface, aipo, tomate e rabanete.

Na Índia, Pingulkar *et al.* (2001), analisaram 116 amostras de vegetais diversos, não isolaram *L. monocytogenes* em nenhuma das saladas prontas para consumo analisadas.

Em Espanha, Soriano *et al.* (2001), pesquisaram a presença de espécies de *Listeria* em 40 amostras de alface e espinafre, 20 “in natura” e 20 prontas para consumo. Os

resultados revelaram uma frequência de 10% de *L. monocytogenes* nas amostras de alface “in natura” e também uma frequência de 10 % na alface pronta para consumo.

Johannessen *et al.* (2002), na Noruega, avaliaram 200 amostras de diferentes tipos de alface e 100 amostras de saladas pré-cortadas. *L. monocytogenes* estava presente em 1 amostra de alface (0,5%) e nas saladas o microrganismo não foi encontrado. Os pesquisadores sugerem que a ausência de *L. monocytogenes* em certos produtos pode ser atribuída ao pouco contacto da planta com o solo. Esta contaminação terá tendência a aumentar, devido às inundações causadas pela mudança do regime hídrico, resultante das alterações climáticas.

Amostras prontas para o consumo também foram analisadas por Sagoo *et al.* (2003a, b) no Reino Unido. Os resultados de ambos os estudos revelaram uma baixa ocorrência de *L. monocytogenes*, que variou entre 2,3 e 3% do total de amostras (2950 e 3852, respectivamente).

Os dados apresentados indicam a ocorrência de *L. monocytogenes* em vegetais e saladas minimamente processadas, bem como a ocorrência de um grande número de surtos alimentares por todo o mundo. A conjugação destes dois factores faz com que o conhecimento do desenvolvimento de *L. monocytogenes* em saladas minimamente processadas adquira extrema importância para assegurar a manutenção da segurança dos consumidores, visto que a sua taxa de mortalidade é elevada.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 – Saladas Minimamente Processadas

As saladas minimamente processadas (MP) são submetidas a um processamento mínimo que tem, como principal objectivo, tornar o produto pronto para o consumo, garantindo as características relativas à frescura e respondendo, dessa forma, às necessidades do consumidor por um produto mais conveniente, fresco e saudável (Alzamora *et al.*, 2000).

Uma ou várias operações, incluindo a selecção, lavagem, descasque e/ou corte, sanificação e embalagem, são aplicadas neste tipo de produto, permitindo, assim, o consumo directo. Porém, nenhuma destas operações garante a esterilidade ou estabilidade do produto e, por isso, devem ser mantidos sob refrigeração.

Quando a qualidade da matéria-prima e as condições de processamento e de conservação são afectadas, permitindo a contaminação, a sobrevivência e/ou multiplicação de microrganismos, inclusive de patogénicos, o aspecto visual deste tipo de produto é comprometido.

A forma como os vegetais MP são apresentados ao consumidor depende do tipo de vegetal e do grau de processamento, podendo ser comercializados produtos inteiros, cortados ou picados. Neste último caso, o rompimento celular é normalmente muito intenso o que favorece a deterioração, tanto de natureza química/bioquímica como microbiológica. Por um lado ocorre contacto entre enzimas e substratos, por outro verifica-se perda de nutrientes por lixiviação. A acção de enzimas, provoca um rápido escurecimento sobretudo nas superfícies de corte (PPO) e o amolecimento dos tecidos (enzimas pectinolíticas). Já a deterioração microbiana é causada pela acção de microrganismos remanescentes do processamento que se manifestam, selectivamente, em função das condições do processamento utilizado.

A procura de vegetais MP saudáveis e de fácil/pronta utilização tem aumentado, sendo a necessidade de os tornar estáveis e seguros um desafio para investigadores e processadores. O aumento do tempo de vida útil, importante sob o ponto de vista

comercial, poderá contribuir para o aumento do risco de doenças veiculadas por estes alimentos.

### **2.1.1. Principais operações unitárias dos Vegetais Minimamente**

#### **Processados**

A colheita, manipulação, processamento e distribuição industrial dos produtos hortícolas constituem operações de natureza física, ainda que os seus efeitos possam conduzir a alterações biológicas, químicas e físicas dos produtos.

A manipulação que antecede o consumo, inclui todo o processamento desde o campo até às vitrinas de exposição. Uma forma de preservar a qualidade dos produtos é proceder à manipulação rápida, assim como pré-refrigerar a matéria-prima minimizando os danos físicos.

A colheita deve efectuar-se durante a noite ou às primeiras horas do dia, quando se verificam as temperaturas mais baixas, que é o mais vantajoso para a manutenção da qualidade dos vegetais durante a manipulação e o armazenamento. A estrutura delicada de muitos produtos hortícolas requer uma manipulação cuidadosa, daí que muitos produtos destinados ao mercado de frescos ou à produção de vegetais minimamente processados, sejam colhidos manualmente. No entanto, para alguns produtos, a colheita mecânica, por ser mais rápida e reduzir o tempo de permanência dos vegetais no campo, melhora a qualidade quando comparada com a colheita manual.

Quanto ao processamento que tem lugar no local de produção, inclui a calibração, escolha e pré-arrefecimento. O pré-arrefecimento pode efectuar-se com recurso a ar forçado, água, ar e água (arrefecimento por pulverização combinada com ar forçado) ou vácuo. O produto deve manter-se a uma temperatura moderada durante um certo período de tempo antes do seu armazenamento a baixas temperaturas (Wiley, 1997). Todo o equipamento de recolha deverá manter-se limpo para evitar alterações causadas por fungos e bactérias. Os recipientes devem ser lavados diariamente para reduzir a carga microbiana.

O transporte deve ser realizado o mais rapidamente possível e de forma cuidadosa. A selecção do transporte em recipientes ou a granel depende do produto e das exigências comerciais e económicas. O transporte a granel de hortícolas com folhas e

talos com aplicação de gelo fundente, faz descer a temperatura ao mesmo tempo que mantém a humidade relativa elevada durante o transporte. Não devem transportar-se no mesmo contentor os produtos hortícolas e os frutos que requeiram temperaturas e condições de humidade relativa diferentes.

A recepção dos produtos na unidade fabril, constitui um momento em que a cadeia de frio se interrompe e em consequência deve ter-se o máximo cuidado para que não se perca a qualidade que se manteve durante as fases de colheita e transporte. Durante a recepção procede-se à avaliação da qualidade dos produtos frescos.

#### **2.1.1.1. - Operações de separação e selecção**

Os factores mais importantes para seleccionar os vegetais são a cor, friabilidade, firmeza e frescura. É importante retirar as partes danificadas e alteradas para evitar que as alterações sejam transmitidas às restantes partes dos produtos. A selecção é a última etapa antes do processamento.

#### **2.1.1.2. - Limpeza, lavagem e descontaminação**

Para a maioria dos produtos hortícolas e frutos, a limpeza e lavagem podem ser os únicos tratamentos de conservação. A limpeza refere-se à eliminação de detritos estranhos e a lavagem é efectuada mediante aplicação de água clorada a uma concentração de 150-200 ppm. Após descontaminação deve proceder-se a um enxaguamento com água potável e deve eliminar-se o excesso de humidade. A secagem é normalmente efectuada por centrifugação do produto e depende da velocidade de rotação e do tempo. As operações de processamento de produtos hortícolas e frutos MP, ou seja, o corte, a lavagem e a centrifugação deverão ser efectuadas o mais rapidamente possível. O desenho do equipamento deve estar de acordo com a natureza do produto hortícola e a necessidade de eliminação máxima da sujidade, utilizando a menor quantidade de água possível e evitando danos no produto, com o objectivo de maximizar o rendimento do processo (Filipe, 2005). A água deverá ser pulverizada a baixa pressão, sobre os produtos, para que estes não estejam em contacto com água suja. Nas lavadoras cilíndricas de folhosas, a água é pulverizada a uma pressão média, nomeadamente no caso de espinafres, alface, salsa, canónigos e alho francês. A humidade residual e o exsudado celular na superfície dos hortícolas tendem a estimular a multiplicação microbiana de leveduras, bactérias e bolores. Daí que, seja importante eliminar restos de água nos produtos tratados, após a lavagem.

### **2.1.1.3. - Operação de redução de dimensão – Corte**

Esta operação contribui para facilitar a utilização. O corte, no entanto, tem certos inconvenientes, pois provoca danos mecânicos e conseqüentemente verifica-se o aumento da actividade metabólica com aceleração da taxa respiratória e de produção de etileno, com o conseqüente amolecimento do tecido vegetal. Pelo exposto os produtos cortados devam ser colocados a 4 °C imediatamente após o corte.

Tendo em conta os fluidos libertados durante a operação de corte, as cortadoras podem ser um ponto crítico neste processo, caso não exista um bom sistema de HACCP (Varkasas e Loannis, 2008).

### **2.1.2 -Métodos de conservação de produtos hortícolas refrigerados minimamente processados**

As temperaturas de refrigeração e a embalagem são as barreiras utilizadas na protecção do alimento minimamente processado. A embalagem previne a contaminação pós processamento (Wiley, 1997).

### **2.1.3. - Aspectos microbiológicos e enzimáticos de alteração dos vegetais minimamente processados**

Os vegetais visados no presente estudo podem constituir um risco potencial para a saúde pública se manipulados incorrectamente. Estes produtos possuem os seguintes atributos:

- São produtos que têm pH superior a 4,6
- $a_w$  superior a 0,85
- Não recebem tratamento térmico adequado para inactivar os microrganismos responsáveis por toxinfecções, podendo, através da sua persistência ou multiplicação no produto, originar um risco para a saúde sob condições moderadas de abuso de temperatura durante o armazenamento e distribuição.
- Não apresentam obstáculos induzidos tanto por factores intrínsecos (por ex. presença de nitritos) como factores extrínsecos, (por ex. quantidade de sal ou um tratamento térmico para o controlo de microrganismos patogénicos) para eliminar ou prevenir a multiplicação de microrganismos patogénicos causadores de toxinfecções (Filipe, 2005).

A actividade enzimática constitui um problema na conservação dos vegetais MP. As polifenoloxidasas (PPO) são umas das enzimas mais importantes no processamento de vegetais dado que catalizam reacções que conduzem ao acastanhamento. Outras enzimas importantes do ponto de vista da qualidade, são as enzimas pectinolíticas: pectinasmetilesterase (PME) e as poligalacturonase (PGs) que estão relacionadas com o amolecimento e perda de integridade dos tecidos vegetais. As peroxidases (POs), catalases e lipoxigenases que originalmente se associam às mudanças de *flavour*, podem também estar envolvidas na mudança de cor dos tecidos (Wiley, 1997).

Para alcançar qualidade e segurança, deve ter-se em conta tanto os microrganismos patogénicos dos próprios vegetais, como também os microrganismos introduzidos pelos manipuladores (Filipe, 2005), bem como outros factores.

#### **2.1.4 - Composição da atmosfera interna das embalagens**

A utilização de atmosferas modificadas é uma metodologia usual para manter frescos os vegetais e prolongar a sua vida útil. Esta técnica consiste na substituição da atmosfera normal por uma de composição determinada para cada tipo de vegetal

#### **2.1.5 - Conservação pelo frio**

O armazenamento em refrigeração durante a distribuição e venda é uma etapa necessária e exigível nos produtos hortícolas MP. Esta baseia-se no facto de que as temperaturas de refrigeração tornam mais lenta a multiplicação da maioria dos microrganismos e diminuem a velocidade das reacções metabólicas (Filipe, 2005).

A maioria das reacções metabólicas que os agentes patogénicos provocam nos tecidos dos produtos hortícolas são catalizadas por enzimas. Para o controlo desta actividade enzimática são absolutamente necessárias baixas temperaturas na cadeia de produção. Os microrganismos psicrotróficos crescem a baixas temperaturas e são os principais responsáveis pelas alterações destes alimentos.

#### **2.1.6 - Embalagem**

Há já vários anos que se utilizam embalagens de película plástica não perfurada, de permeabilidade selectiva com o objectivo de minimizar a perda de humidade e reduzir

a taxa respiratória dos produtos vegetais. A utilização de embalagens plásticas, de permeabilidade selectiva, constitui uma forma passiva de modificação da atmosfera. O uso da embalagem plástica, não perfurada e hermética, cumprindo perfeitamente as características seleccionadas de permeabilidade aos gases, em conjunto com o arrefecimento/ preparação e tratamento sanitário apropriado na fase de pré-embalagem, é a ferramenta apropriada para alcançar uma vida útil adequada, tanto para os produtos não processados como para os hortícolas MP (Filipe, 2005).

Quando se embalam produtos hortícolas MP em películas plásticas de permeabilidade aos gases relativamente baixa, produz-se, no interior da embalagem, uma descida da concentração de O<sub>2</sub> e um aumento da concentração de CO<sub>2</sub>, consequência da própria respiração dos tecidos. Eventualmente a concentração de O<sub>2</sub> baixará até ao nível em que a anóxia dos tecidos é induzida, enquanto que, simultaneamente, ocorre um aumento da concentração de CO<sub>2</sub> que intensifica a anaerobiose da atmosfera da embalagem. Esta respiração anaeróbica no produto origina uma rápida alteração da sua qualidade, pela degradação de tecidos, acumulação de etanol e de acetaldeído e desenvolvimento de maus odores, resultantes do crescimento microbiano.

## **2.2 – Ecologia microbiana das saladas minimamente processadas**

A microflora destes produtos pode variar consideravelmente, dependendo do tipo de vegetal, condições ambientais e sazonalidade. O modo como estes alimentos são armazenados poderá permitir o desenvolvimento de grupos particulares de microrganismos (Doyle *et al.*, 2001).

A maioria das bactérias que aderem à superfície dos produtos, antes da colheita são saprófitas e Gram negativos. Alguns dos patogénicos associados aos produtos agrícolas “in natura” incluem: *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter freundii*, estirpes enteropatogénicas de *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* e *A. caviae*, vírus da hepatite A. (Alzamora *et al.*, 2001).

Pesquisas têm demonstrado que bactérias patogénicas, como por exemplo *L. monocytogenes*, podem sobreviver e multiplicar-se em diferentes tipos de vegetais incluindo rebentos de feijão, pepino, batata, tomate, repolho, couve-flor, alface, rabanete e cenoura entre outros (Lin *et al.*, 1996; Sizmur e Walker, 1988; Beuchat,

2002). É conveniente conhecer actualmente que cada vez mais as baixas temperaturas não são barreiras eficazes contra o desenvolvimento de agentes de toxinfecções alimentares, como anteriormente foi aceite pela indústria alimentar. A importante emergência de microrganismos patogénicos não formadores de esporos, capazes de se multiplicarem a esta temperatura, tais como *L. monocytogenes* podem originar enormes problemas sanitários nos alimentos refrigerados (Wiley, 1997).

Com o objectivo de controlar o crescimento dos microrganismos e oferecer um produto mais próximo do natural, as indústrias alimentares, adoptam muitas vezes, processos tecnológicos, como por exemplo, embalagens com atmosfera modificada, cuja influencia sobre o comportamento dos microrganismos ainda não é completamente conhecida (Fröder, 2005).

### **2.3 – *Listeria monocytogenes***

Em 1924, Murray et al., isolou um pequeno bacilo Gram positivo a partir do sangue de coelhos infectados, ao qual foi dado o nome de *Bacterium monocytogenes*. Três anos depois, Pirie isolou uma bactéria do fígado de ratos doentes, a qual denominou de *Listerella hepatolytica*, em honra de Lord Lister. Após a descoberta de que *Bacterium monocytogenes* e *Listerella hepatolytica* se tratavam do mesmo microrganismo, o nome foi alterado para *Listerella monocytogenes*, designação usada durante os 12 anos seguintes. Em 1939, foi descoberto que o nome *Listerella* já tinha sido usado para designar um grupo de bolores, em 1906. Assim, no ano seguinte a designação deste microrganismo foi alterada para *Listeria monocytogenes* (Ryser e Marth, 1991)

São conhecidas sete espécies de *Listeria*: *L. innocua*, *L. grayi* e *L. murrayi*, consideradas não patogénicas, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri* raramente causam infecções nos humanos, enquanto *L. monocytogenes* é patogénica e a mais importante espécie nos casos de infecções transmitidas pelos alimentos (Leclercq, 2004)

A espécie *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram positiva, que não produz esporos nem cápsula, com a forma de bacilo (0,4 - 0,5 µm x 0,5 – 2,0 µm), regular, com as extremidades arredondadas. Os bacilos podem ocorrer isolados, em cadeias curtas, em arranjos em forma de Y ou V ou ainda em paliçada. Em culturas mais velhas ou

em rugosas podem aparecer longos filamentos com 6 a 20  $\mu\text{m}$  (desenvolvidas após 3 – 5 dias de incubação) (Seeliger e Jones, 1986).

Apresenta mobilidade por meio de alguns flagelos periféricos quando cresce a temperaturas da ordem dos 20 – 25 °C. Esta mobilidade é muito característica, do tipo “tumbling” (tropeçante), que pode ser utilizada na identificação deste organismo (Gameiro, 2004).

*L. monocytogenes* é uma bactéria ubíqua, com capacidade de se desenvolver em condições inóspitas para outros microrganismos patogénicos, que se pode multiplicar a temperaturas entre 0 a 45°C (Doyle *et al.*, 2001). Encontra-se amplamente distribuída na natureza, facto que explica a facilidade com que é encontrada em alimentos, desde a produção até o consumo (Bechaut, 1996). O pH de multiplicação de *L. monocytogenes* varia entre 4,4 e 9,6, mas multiplica-se melhor entre 6 e 8, sendo o seu pH óptimo de 7,0. *Listeria* é um dos poucos microrganismos patogénicos que pode multiplicar-se em substratos com actividade da água ( $a_w$ ) tão baixa quanto 0,93 e em meios de cultura com concentrações de NaCl de 10% (Ryser e Marth, 1991).

Esta bactéria pode ser aeróbia ou anaeróbia facultativa. Quando inoculada num Caldo de Triptose, é observado um crescimento abundante ligeiramente abaixo da superfície do meio, o que indica uma tendência para este microrganismo crescer melhor quando sujeito a uma tensão de  $\text{O}_2$  inferior à do ar. Pode ainda verificar-se um excelente crescimento após substituição parcial do  $\text{O}_2$  por  $\text{CO}_2$ , no entanto, pode não crescer em condições anaeróbias estritas (Georges e Lund, 1992).

A espécie *L. monocytogenes* é quimiorganotrófica, apresenta exigências nutritivas especiais e é capaz de se reproduzir num meio sintético simples (Gameiro, 2004). Necessita de vários aminoácidos para o seu desenvolvimento, entre eles, cisteína, leucina, isoleucina, arginina, valina, riboflavina, biotina e metionina, sendo a sua multiplicação estimulada pela presença de  $\text{Fe}^{3+}$  e fenilalanina. A glucose e a glutamina são necessárias pois funcionam como fontes primárias de carbono e de nitrogénio (Ryser e Marth, 1991).

### 2.3.1 – *Listeria monocytogenes* em saladas minimamente processadas

A pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo é de grande importância, pois sabe-se que os alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose são principalmente produtos processados industrialmente, mantidos sob refrigeração, com vida de prateleira longa, e que oferecem condições adequadas para a sua multiplicação (McLauchlin, 1996).

A ocorrência de *L. monocytogenes* conduziu a uma preocupação em avaliar o comportamento do patogénico inicialmente nos vegetais “in natura” e, depois, nos vegetais prontos para o consumo (Ryser e Marth, 1991). A sobrevivência e multiplicação de *L. monocytogenes* em produtos “in natura” são afectadas por diferentes factores, tais como idade e tipo de produto, nível de contaminação, temperaturas de armazenamento e atmosfera (Bennik *et al.*, 1996).

As plantas e as suas partes comestíveis podem apresentar *L. monocytogenes*, aderente à sua superfície devido à formação de biofilmes. Isso poderá ter um papel importante na disseminação deste patogénico do seu habitat natural até ao ambiente industrial, contaminando equipamentos e depósitos e/ou locais de armazenamento (Fröder, 2005).

Os alimentos contaminam-se geralmente a partir de fontes ambientais, animais ou inertes (solos, águas, vegetais e vectores animais). Os alimentos de origem vegetal consumidos crus sem desinfeção adequada, podem ser sujeitos a contaminações fecais humanas directas, embora raramente, e a contaminações indirectas e cruzadas através das águas de rega ou da chuva contaminadas (Filipe, 2005)

Eliminar este microrganismo dos alimentos é extremamente difícil quer pela sua larga distribuição, quer pela sua capacidade de crescer a temperaturas de refrigeração (4 °C). A prevenção de casos de listeriose requer a validação do controle dos pontos críticos do processamento (Varkasas e Loannis, 2008).

### **2.3.1.1 – Influência da microflora no crescimento de *Listeria monocytogenes***

O desenvolvimento de biofilmes pode ocorrer durante o crescimento e a maturação dos vegetais, bem como na colheita, transporte, processamento e armazenamento. Não existe informação quanto ao comportamento de *L. monocytogenes* ou de outros microrganismos patogénicos em biofilmes formados pela microflora associada aos vegetais (Beuchat, 2002). Seria portanto necessário simular a produção de biofilmes em vegetais com o objectivo de determinar o comportamento de *L. monocytogenes*.

Um estudo, realizado por Guillier *et al.* (2008) que teve como objectivo, investigar de que forma a microflora presente em biofilmes formados nas prateleiras de madeira utilizadas na cura de queijos, tem influência no desenvolvimento de *L. monocytogenes*, indicou que em comparação com a monocultura desta bactéria, a taxa de crescimento em co-cultura não é mais baixa, mas o crescimento do microrganismo cessa assim que a restante microflora entra na fase estacionária. Esta redução da densidade populacional máxima pode ser explicada pelo consumo e esgotamento dos nutrientes, pela restante microflora, visto que neste trabalho não foi detectada a presença de inibidores de crescimento produzidos pela microflora presente no biofilme.

Outros estudos mencionados em Guillier *et al.* (2008) descrevem a inibição de *L. monocytogenes* pelas bactérias presentes na superfície de queijos curados. Esta inibição foi por vezes explicada pela produção de bacteriocinas ou pela produção de outros compostos anti-*Listeria*, produzidos pela restante microflora. Noutros estudos, embora defendam a presença de efeito de inibição, não conseguem identificar quais os mecanismos associados à mesma, sendo uma das hipóteses levantada a competição por nutrientes.

Vários estudos observaram uma inibição no crescimento de *L. monocytogenes* por bactérias não produtoras de bacteriocinas em meios de enriquecimento (Mellefont *et al.*, 2008) ou em salmão fumado refrigerado (Mejlholm and Dalgaard, 2007), sendo neste caso a inibição de *L. monocytogenes* atribuída à competição por nutrientes.

## 2.4 – Listeriose, surtos alimentares

Nos últimos anos, têm-se estudado e referido, inúmeros casos e surtos de listeriose humana em todo o mundo, mas particularmente na Europa e América do Norte (Farber e Peterkin, 1991).

A listeriose afecta principalmente segmentos específicos da população que apresentam maior vulnerabilidade. Basicamente, *L. monocytogenes* é um microrganismo oportunista que afecta quase sempre pessoas com uma doença ou uma circunstância subjacente grave por ex. pessoas imunodeprimidas, infectadas com HIV/SIDA e/ ou infecções crónicas, grávidas (20 vezes mais sensíveis que a população normal), fetos e recém-nascidos e idosos (300 vezes mais sensíveis) (FAO/OMS, 2004).

A listeriose transmitida por alimentos é uma doença relativamente pouco comum mas grave, com elevadas taxas de mortalidade (20 a 30%), quando comparadas com as de outros microrganismos patogénicos transmitidos por alimentos, como a *Salmonella* (FAO/OMS, 2004). A maioria dos casos de listeriose humana são esporádicos ou surtos cuja delimitação geográfica e/ ou temporal é geralmente difusa. A transmissão de *L. monocytogenes* pode ser também vertical (de mãe para filho), zoonótica (de animal para pessoa) ou nosocomial (contraída em hospital), A importância dos alimentos como via primária de transmissão às pessoas, de *L. monocytogenes*, não era reconhecida até à década de 80, quando aconteceram várias grandes epidemias de listeriose de origem comum, no Norte da América e na Europa (Miller *et al.*, 1990).

As infecções de *L. monocytogenes* podem causar um risco vital, com taxas de letalidade de 20 a 30 %. Os dados existentes indicam que, todas as estirpes de *L. monocytogenes* são patogénicas. A virulência relativa dos isolados individuais de *L. monocytogenes* podem variar consideravelmente (Hof e Rocourt, 1992), e as variações da virulência definidas em estudos experimentais com animais, podem alcançar até um factor de 1000. De forma similar, existem provas de que há variação da virulência entre as diferentes estirpes isoladas de *L. monocytogenes* em alimentos (Neves *et al.*, 2008) A maioria dos casos de listeriose encontram-se associados a um número limitado de serótipos: 1/2a (1,5 – 2,5 %); 1/2b (10 – 35 %); 1/2c (0 – 4 %); 3 (1 – 2 %); 4b (37 – 64 %); e 4 não b (0 – 6 %) (Farber e Peterkin, 1991). No entanto, não foram detectadas provas coerentes de

maior virulência associada a nenhum serótipo ou subtipo em especial, em estudos com animais “in vitro” (Pine *et al.*, 1991).

Actualmente, sabe-se da existência de duas categorias de listeriose humana: listeriose invasiva e listeriose não invasiva. A listeriose invasiva engloba os casos em que uma infecção inicial do tecido intestinal por *L. monocytogenes* provoca a invasão de partes do organismo que são habitualmente estéreis, como o útero grávido, o sistema nervoso central e o sangue. Um resumo de 782 casos de listeriose notificados em 20 países reflectiram que 43% das infecções estavam relacionadas com a gravidez, 29 % correspondiam a infecções septicémicas e 24 % a infecções do sistema nervoso central (Rocourt, 1991 in (FAO/OMS, 2004). A característica epidemiológica habitual deste tipo de listeriose é a existência de casos esporádicos relativamente frequentes e ocorrência ocasional de surtos. No entanto, alguns dos casos esporádicos podem ser surtos de origem comum não reconhecidos (FAO/OMS, 2004).

A listeriose não invasiva, também conhecida como gastroenterite febril por *Listeria*, foi observada principalmente em algumas epidemias, apresentando na maioria dos casos sintomas de gastroenterite, como diarreia, febre, cefaleia e mialgia, sendo o seu período de incubação curto (Aureli *et al.*, 2000). Estas epidemias ocorrem geralmente devido à ingestão de doses elevadas de *L. monocytogenes* por pessoas sãs. Não se conhece a incidência, nem os factores que ocasionam a aparição desta forma de listeriose em casos esporádicos (FAO/OMS, 2004).

Segundo o regulamento (CE) N° 2073 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 alterado pelo regulamento (CE) 1441/2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, a dose para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo não susceptíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes* é de  $1,0 \times 10^2$  ufc/g.

## 2.5 – Análise Sensorial

A análise sensorial é uma medida científica usada para analisar e interpretar as reacções humanas perante certas características dos alimentos que são percebidas pelos sentidos. É um exame das características de um produto mediante os órgãos dos sentidos (Granados, 2000).

Actualmente existe um conjunto de regras mais ou menos normalizadas e aceites (ASTM, 1968 in Louro e Nunes, 1988) que transforma a avaliação sensorial num método de medida de uma ou várias propriedades dos alimentos, com os requisitos de fiabilidade e reprodutibilidade que terão os métodos químicos e físicos (Costell e Duran, 1981 in Louro e Nunes, 1988).

Segundo Costell e Duran, (1981) os métodos de análise sensorial podem ser divididos em analíticos e afectivos. Os testes analíticos indicam diferenças entre produtos ou descrevem uma ou mais das suas características, enquanto que os testes afectivos são utilizados para conhecer a opinião dos consumidores sobre determinado produto. Assim, o teste de análise sensorial realizado neste trabalho foi um teste analítico, do tipo descritivo.

Os testes descritivos são aqueles que nos permitem indicar para além da possível existência de diferença entre amostras, a magnitude dessas diferenças e a sua caracterização. Para este teste descritivo as características do produto foram definidas numa escala, tratando-se assim se uma prova escalar (Louro e Nunes, 1988).

Na execução dos testes sensoriais devem ter-se em conta os aspectos ambientais da prova assim como outros aspectos de que dependa a reacção sensorial dos provadores. Uma sala de provas deverá ter uma temperatura e humidade relativa agradáveis (20 – 22 °C e 60 – 70 % humidade relativa), com renovação de ar e boa iluminação, de preferência difusa. As cores da sala não deverão ser agressivas e em geral recomenda-se um cinzento neutro (Amerin, 1965 in Louro e Nunes, 1988).

Os gabinetes de prova deverão estar separados entre si (sem serem fechados), de forma a não permitir o contacto entre os juízes. Não necessitam ser grandes, mas devem ter uma mesa onde se procede à prova, um pequeno lavatório, uma janela por onde são admitidas as provas e uma cadeira cómoda (Louro e Nunes, 1988).

Para além dos aspectos ambientais existe um certo número de factores relacionados com os próprios juízes e com a apresentação das amostras que deverão ser tidos em conta para se conseguir uma análise mais eficaz. Os juízes devem estar conscientes que a utilização de perfumes intensos, fumar antes das provas (cerca de 30 minutos antes), ou a acção de outros estímulos fortes pode levar a um menor acerto na avaliação das mesmas.

A apresentação das amostras deverá ser feita com códigos de três números para cada amostra, evitando assim que os juízes produzam inter-relações entre amostras. As diversas amostras em que se pretende analisar uma mesma característica deverão ser apresentadas de forma homogênea, no mesmo tipo de recipiente e a temperatura semelhante.

Também se deve atender à hora das provas, em geral procura-se fazer as provas entre as 10 e 12 horas ou entre as 15 e 17 horas, pois são períodos que correspondem ao intervalo entre refeições em que a generalidade das pessoas ainda não têm fome, mas não estão totalmente saciadas, não se introduzindo assim factores de estímulo estranhos.

### 3 – Materiais e Métodos

#### 3.1 - Estirpes microbianas

Para este estudo foi utilizada uma estirpe de *L. monocytogenes* 1/2a EGDe pertencente à coleção do Institut Pasteur (Isolada de um animal), uma estirpe de referência de *L. monocytogenes* 4b NCTC 11994 (Isolada de um caso de listeriose humana associado ao consumo de queijo) e uma estirpe de referência de *Aeromonas hydrophyla* ATCC 7966, REF 0870S, LOT 870213 (Microbiologics®, Minnessota).

#### 3.2 – Amostras de saladas

Foram analisadas 67 amostras de saladas minimamente processadas (AMP; produtos 4ª Gama) prontas para consumo, de fabricantes, marcas e variedades diferentes (Quadro 1), adquiridas em duas grandes superfícies comerciais de distribuição na área da Grande Lisboa (Quadro 2). As amostras foram recolhidas ao longo de 6 meses, entre Março e Agosto de 2008, em número compatível com a execução analítica e tratamento estatístico.

**Quadro 1 – Ingredientes e composição das amostras de saladas**

<b>Variedades</b>	<b>Composição</b>
César	Alface romana
Gourmet	Escarola frisada, radicio e canónigos
Mescla	Espinafre, espinafre vermelho, acelga e mizuna
Ibéria	Alface verde, alface roxa e rúcola

**Quadro 2 – Distribuição do número de amostras por marca e variedade de salada**

<b>Variedades</b>	<b>Marca A</b>	<b>Marca F</b>	<b>Marca Q</b>
César	-	13	-
Gourmet	10	13	5
Mescla	-	-	12
Ibéria	-	-	12

### 3.3 – Meios e reagentes

#### 3.3.1 – Meios utilizados na contagem de microrganismos psicotróficos aeróbios totais

A contagem de microrganismos psicotróficos foi feita através da utilização do meio de cultura sólido *Standard Methods Agar* (PCA) (bioMerieux® SA, Marcy l'Etoile, França) (Anexo 1). Este meio de cultura apresenta substâncias nutritivas, factores de crescimento e fontes de energia que favorecem o crescimento da maior parte dos microrganismos, incluindo bactérias, bolores e leveduras (Figura 1) ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))



**Figura 1** – Colónias características de psicotróficos aeróbios

#### 3.3.2 – Meios utilizados na contagem de *Enterobacteriaceae*

Para a contagem de bactérias pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* utilizou-se o meio de cultura sólido *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBG) (bioMerieux® SA, Marcy l'Etoile, França) (Anexo 2). A presença no meio de sais biliares e cristal violeta inibe as bactérias Gram positivas e algumas bactérias Gram negativas. A fermentação da glucose é detectada pela viragem do indicador de pH (potencial hidrogeniónico), de vermelho neutro para rosa intenso (Figura 2) ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)).



**Figura 2** – Colónias características de *Enterobacteriaceae*

### 3.3.3 – Meios utilizados na contagem de *Escherichia coli*

Para realizar a contagem de *E. coli* utilizou-se o meio de cultura sólido *Tryptone Bile X-Glucuronide* (TBX) (Bio-Rad™, Marne-la-Coquette, França) (Anexo 3). Em comparação com outros meios existentes anteriormente este último apresenta as vantagens de permitir uma detecção mais rápida, uma maior recuperação e ainda permitir a detecção de estirpes com fraca fermentação da lactose. Este meio contém um substrato cromogénico – 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucuronidase (X-glucuronideo), que é degradado pela enzima  $\beta$ -glucuronidase, produzida pela maior parte das estirpes de *E. coli* (apenas 3 a 4% são

$\beta$ -glucuronidase negativas, incluindo o serovar O157) por quebra da ligação do açúcar com o cromogénio. O facto de se tratar de uma substância insolúvel promove a sua acumulação no interior da célula, levando à formação de colónias azuis muito fáceis de identificar e diferenciar da flora envolvente (Figura 3), não sendo necessária confirmação. O meio TBX apresenta ainda sais biliares que inibem o crescimento das bactérias Gram positivas (www.bio-rad.com).



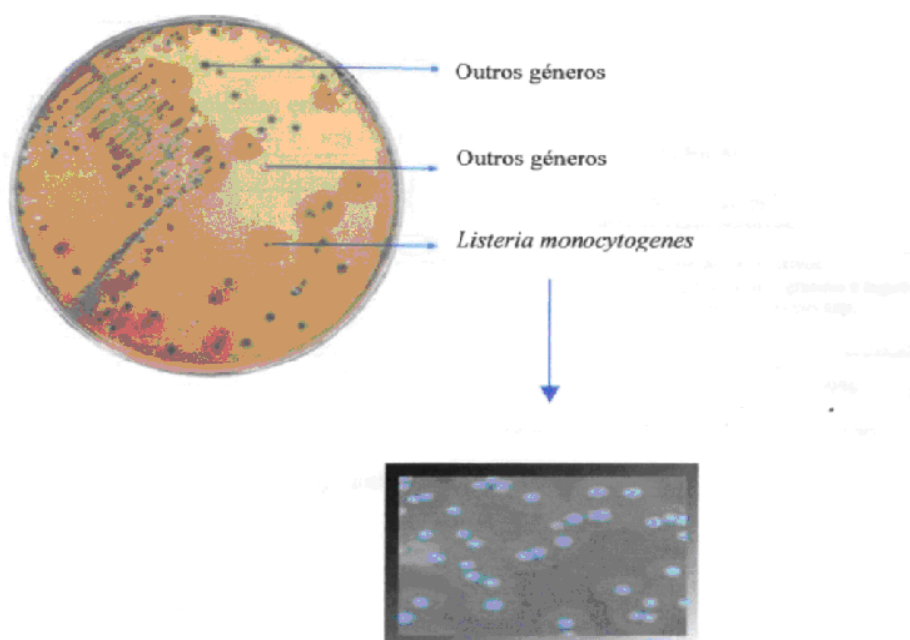
**Figura 3** – Colónias características de *Escherichia coli* (<http://images.google.pt>)

### 3.3.4 – Meios utilizados na contagem de *Listeria spp.*

A contagem de *Listeria spp.* foi feita através da utilização de *Agar Listeria* segundo Ottaviani & Agosti (ALOA) (bioMerieux® SA, Marcy L'Étoile, França; CHROMagar, Paris, França; Laboratoires AES™, Bruz, França) (Anexo 4). Este meio é baseado na detecção simultânea das actividades de *phosphatidylinositol-specific phospholipase C* (PIPLC) e de  $\beta$ -glucosidase. A enzima PIPLC, associada ao processo de virulência, está presente em *L. monocytogenes*. No meio ALOA, esta actividade é detectada através da degradação

de L-alpha-phosphatidylinositol, que está presente no agar, produzindo um precipitado opaco (Figura 4) que forma um halo à volta das colónias. A actividade da  $\beta$ -glucosidase é detectado pelo substrato cromogénico, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-  $\beta$ -D-glucoside, que se hidrolisa e produz um precipitado azul em todas as colónias de *Listeria*. O halo opaco formado à volta das colónias azuis, é a característica que nos indica estar perante a presença de colónias de *L. monocytogenes* (Leclercq, 2004) A selectividade do meio é conferida pela acção combinada do cloreto de lítio e dos antibióticos (ácido nalidíxico, ceftazidima e polimixina B).

Para isolamento de colónias suspeitas foi usado o meio de isolamento não selectivo, *Tryptone Soya Agar* (TSA) (bioMerieux®SA, Marcy L'Étoile, França) (Anexo 5) ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)).



**Figura 4** – Colónias características de *Listeria monocytogenes* em meio ALOA (adaptado de Gameiro, 2004 in <http://www.images.google.pt>)

### 3.3.5 – Meios utilizados na contagem de *Aeromonas hydrophila*

Para contagem destes microrganismos foi usado *Aeromonas Medium Base* (AMB) (Ryan) (Oxoid™, Cambridge, UK) (Anexo 6). Este meio surgiu porque Ryan modificou a fórmula do meio *Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar* (XLD) de forma a permitir o crescimento de *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas* spp. bem como o crescimento habitual

de *Enterobacteriaceae*. Este meio de cultura foi adicionado de ampicilina, na concentração de 5 mg/L, recomendado pelo fabricante, com o objectivo de melhorar o seu desempenho no isolamento de *Aeromonas* spp. (www.oxid.com). Para posterior identificação as colónias suspeitas foram isoladas e mantidas em meio TSA.

### 3.3.6 – Meios utilizados na contagem de *Clostridium perfringens*

O meio de cultura *Tryptone Sulfite Cycloserine Agar* (TSC) (Biokar Diagnostics™, Beauvais, França) (Anexo 7) foi utilizado na contagem de *C. perfringens*. A presença neste meio de cultura de sulfito de sódio permite aos microrganismos redutores de sulfito, reduzi-lo a sulfureto, que ao reagir com citrato de ferro, também presente no meio, forma sulfureto de ferro, conduzindo ao desenvolvimento de colónias negras. A restante flora é inibida pela D-cicloserina presente no meio (www.oxid.com).



**Figura 5** - Colónias características de *Clostridium perfringens*  
(<http://www.rapidmicrobiology.com/news/995h27.php>)

### 3.3.7 – Meios utilizados na contagem e pesquisa de *Bacillus cereus*

Os meios de cultura utilizados para a contagem e pesquisa de *B. cereus* foram o *Bacillus cereus Agar* (BCA) (Mossel) (Laboratoires AES™, Bruz, França) (Anexo 8), *Columbia Agar* com 5% *Sheep Blood* (COS) (Anexo 9) e Água Peptonada Tamponada (BPW) (Anexo 10) (ambos biomerieux® SA, Marcy L'Étoile, França). O meio de cultura BCA é um meio selectivo devido à adição de Polimixina B, desenvolvido por Mossel *et al.*, que utiliza o extracto de carne e de triptona para favorecer o crescimento deste microrganismo. O sistema de diferenciação de colónias deste meio, baseia-se na

capacidade que a maioria destas estirpes apresentam de produzirem uma lecitinase e não utilizarem o manitol ([www.oxid.com](http://www.oxid.com)). As colónias características são grandes, crenadas, de cor rosa e rodeadas por um halo opaco (Figura 6). O meio COS permite verificar a presença de actividade hemolítica, sendo esta uma característica deste microrganismo. A utilização da BPW teve como objectivo promover a recuperação de microrganismos presentes potencialmente lesados como consequência dos tratamentos a que o produto foi sujeito.



**Figura 6** – Colónia característica de *Bacillus cereus* em meio Mossel

### **3.3.8 – Meios utilizados como diluentes**

Para a realização de diluições das amostras e do inóculo foram utilizados o caldo Triptona Sal (TS) (bioMérieux® SA, Marcy L'Étoile, França) (Anexo 11) e BPW.

O caldo TS é um diluente à base de peptona e de cloreto de sódio ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)).

O caldo BPW não é apenas um meio de pré enriquecimento, como referido em 3.3.7., mas também um diluente, sendo constituído por uma mistura de peptonas ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)).

### **3.3.9 – Meios utilizados na pesquisa de *Salmonella* spp.**

Para proceder à pesquisa de *Salmonella* spp. foi utilizado caldo BPW, caldo *Rappaport Vassiliadis Soja* (RVS-T) (Anexo 12), caldo *Muller-Kauffmann Tetrionato* (MKTTn-T) (Anexo 13), caldo M (Anexo 14) e “kit” VIDAS SLM (Produtos bioMérieux® SA, Marcy L'Étoile, França). O caldo BPW é um pré-enriquecimento não selectivo que permite

que as células de *Salmonella* spp. lesadas e/ou presentes em baixo número, possam recuperar e/ou multiplicar-se antes de serem introduzidas num meio selectivo, aumentando assim as hipóteses da sua detecção nas amostras. O caldo RVS-T contém, para além de fontes de carbono e compostos azotados, cloreto de magnésio (que aumenta a pressão osmótica do meio) e verde de malaquite (agente inibidor da maioria das bactérias, com excepção de *Salmonella* spp.) que associados a um pH baixo, proporcionam um meio selectivo para *Salmonella* spp. ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)). O caldo MKTTn-T apresenta fontes de carbono, azoto, vitaminas e sais minerais. É constituído também por tetrionato que inibe bactérias que não possuam tetrionato redutase (como são exemplo a maioria das bactérias Gram negativas, com excepção de *Salmonellae* e *Proteus*). A inibição de *Proteus* é efectuada pela adição de novobiocina, e a das bactérias Gram positivas é conseguida pela acção de verde brilhante e pela adição de sais biliares ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)). O caldo M contém uma base rica em nutrientes que permite o crescimento de *Salmonella* spp. ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)).

Para isolamento foram usados os meios selectivos sólidos *Xylose-Lysine-Desoxycholate* Agar (XLD) (Anexo 15) e *Gelose chromID<sup>TM</sup> Salmonella* (SM2) (Anexo 16) (ambos bioMérieux® SA, Marcy L'Étoile, França). A diferenciação das bactérias no meio XLD fundamenta-se na fermentação da xilose, descarboxilação da lisina e produção de sulfito de hidrogénio, reacções que permitem uma diferenciação primária de *Shigellae* e *Salmonellae* de outras bactérias patogénicas. As colónias apresentam-se vermelhas com o centro negro. A concentração de desoxilato presente nesta fórmula inibe coliformes sem interferir com o desenvolvimento de *Salmonellae* e *Shigellae* ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)). O meio SM2 é constituído por uma base nutritiva que associa diferentes peptonas promovendo assim o crescimento do conjunto de todas as estirpes de *Salmonella*, e por três substratos cromogénicos que permitem a revelação das actividades enzimáticas correspondentes. A diferenciação de *Salmonellae* (incluindo estirpes lactose positivas) baseia-se na produção da enzima esterase que confere uma coloração rosa pálido a roxo às colónias desta bactéria ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)).

Como meio de diagnóstico foi utilizado o agar de *Triple Sugar Iron* (TSI) (Biogerm, Maia, Portugal) (Anexo 17). Trata-se de um meio que permite verificar se ocorreu a fermentação de três açúcares (lactose, sacarose e glucose), produção de gás e produção de sulfito de hidrogénio ([www.oxid.com](http://www.oxid.com)). Com vista a posterior identificação, as colónias suspeitas foram isoladas e mantidas em meio TSA.

### 3.3.10 – Meios utilizados na pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Para a pesquisa de *L. monocytogenes* utilizou-se o caldo Fraser demi (Cf-d) (Anexo 18), caldo Fraser (Anexo 19) e “kit” VIDAS<sup>®</sup> LMO2 (todos produtos bioMerieux<sup>®</sup> SA, Marcy L'Étoile, França). Os caldos Fraser demi e Fraser apresentam uma constituição semelhante, com a única diferença de o primeiro apresentar metade da concentração de antibióticos do segundo, permitindo durante o primeiro enriquecimento, um melhor crescimento das células eventualmente lesadas. A selectividade destes meios é conseguida pelo cloreto de lítio, acriflavina e o ácido nalidíxico ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))

Como meio de isolamento utilizou-se o meio ALOA, já descrito em 3.3.4. Para isolamento e manutenção de culturas suspeitas utilizou-se meio TSA, também referido no ponto 3.3.4.

### 3.3.11 – Meios utilizados na pesquisa de *Escherichia coli* O157

A pesquisa de *E. coli* O157 foi efectuada com recurso aos meios *Modified Trypticase Soya Broth* (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, França) (Anexo 20) adicionado de novobiocina (Sigma, St Louis, Missouri, USA) na concentração de 20 mg/L (mTSB+N), Caldo MacConkey (MCK) (Anexo 21) (LabM, Bury, Lancashire, USA) com mistura de Cefixima-Telurito (CT) (bioMerieux<sup>®</sup> SA, Marcy L'Étoile, França) (MCK+CT), “kit” VIDAS<sup>®</sup> *E. coli* O157 (ECO) (bioMerieux<sup>®</sup> SA, Marcy L'Étoile, França), “kit” Dynabeads<sup>®</sup> anti - *E. coli* O157 (DynaL Biotech ASA, Oslo, Noruega) e tampão de lavagem (PBS Tween): 0.15 M NaCl, 0.01 M Tampão Sódio-Fosfato, pH 7.4, com 0.05% Tween-20 (autoclavado durante 15 min a 121 °C).

A selectividade do meio mTSB+N baseia-se na presença do antibiótico novobiocina e na temperatura de incubação ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)).

O meio MCK+CT apresenta uma composição que favorece o crescimento de *E. coli*. A presença de bÍlis promove a inibição da maioria das bactérias Gram positivas e a mistura CT inibe as bactérias da famÍlia *Enterobacteriaceae* ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)).

Para isolamento usaram-se os meios selectivos Gelose MacConkey com Sorbitol adicionado da mistura CT (CT-SMAC) (anexo 22) e gelose chromID™ O157:H7 (O157 H7 ID-F) (anexo 23) (ambos bioMerieux® SA, Marcy L'Étoile, França). A presença de sorbitol no meio CT-SMAC permite a diferenciação de *E. coli* O157, visto que este serovar não fermenta o sorbitol e apresenta colónias incolores enquanto que os restantes serovares fermentam o sorbitol apresentando colónias rosas e vermelhas. A selectividade é conferida pela presença de sais biliare e de cristais violeta para as bactérias Gram positivas e pela mistura CT para outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)).

O meio O157 H7 ID-F contém uma mistura de hidratos de carbono e dois substratos cromogénicos para a detecção de duas actividades enzimáticas: a  $\beta$ -D-galactosidase presente em todas as estirpes de *E. coli* e a  $\beta$ -D-glucuronidase específica para todas as estirpes de *E. coli* não O157:H7. As colónias de *E. coli* O157 aparecem com cor verde ou verde-azulada, sendo a selectividade em relação a bactérias Gram positivas fornecida pelo desoxicolato de sódio, enquanto que a mistura CT, permite aumentar a selectividade em relação às bactérias da família das *Enterobacteriaceae* ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)).

O “kit” Dynabeads® anti - *E. coli* O157 foi utilizado com o objectivo de tornar mais eficiente a pesquisa deste microrganismo através da utilização de uma técnica de concentração selectiva desta enterobactéria (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Dynal.html>).

### **3.3.12 – “Kit” utilizado na pesquisa da toxina diarreica de *Bacillus cereus***

Para a pesquisa de toxina diarreica de *B. cereus* foi utilizado o “kit” de detecção de toxinas *Bacillus cereus* Enterotoxin - Reversed Passive Latex Agglutination (BCET-RPLA) (Oxoid™, Cambridge, UK), que utiliza o método de aglutinação passiva de látex invertida ([www.oxoid.com](http://www.oxoid.com)).

### **3.3.13 – Reagentes e “kits” para identificação bioquímica**

Foram utilizados os seguintes reagentes: reagente para detecção da oxidase (N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilediamina dihidroclorato) (bioMerieux® SA, Marcy L'Étoile,

França) (Anexo 24), glucose (Biokar Diagnostics™, Beauvais, França) (Anexo 25), API *Listeria* (bioMérieux® SA, Marcy L'Étoile, França), API 20E (bioMérieux® SA, Marcy L'Étoile, França) e testes de pesquisa de enzimas: Voges-Proskauer, Lisina, Arginina, Ornitina, Glucose, Manitol e Inositol e o “kit” gerador de atmosfera de anaerobiose - Anaerogen (Oxoid™, Basingstone, Hampshire, UK).

O teste da oxidase baseia-se na produção bacteriana de uma enzima, a oxidase intracelular. Na presença de oxigénio atmosférico e de citocromo C, esta enzima oxida o reagente contendo fenilenodiamina, para formar um composto violeta, o indofenol (www.biomerieux.pt). Desta forma, o aparecimento de uma coloração violeta na colónia testada indica a presença desta enzima e considera-se oxidase positiva.

A glucose foi utilizada como método de confirmação das colónias supostas da família *Enterobacteriaceae*. Estas bactérias caracterizam-se por serem todas fermentadoras de glucose (http://users.med.up.pt/cc04-10/Microdesgravadas/8\_Enterobacteriaceas.pdf).

O API *Listeria* (Figura 7) é um sistema padronizado que consiste numa galeria que comporta 10 microtubos contendo os substratos desidratados, que permitem a realização de testes enzimáticos ou fermentações de açúcares. As reacções produzidas durante o período de incubação traduzem-se pelas mudanças de cor espontâneas ou reveladas através da adição de reagentes. A leitura é efectuada com um quadro de leitura (Anexo 26) e a identificação obtém-se consultando a lista dos perfis do folheto informativo ou com um sistema de identificação on-line (www.biomerieux.pt).



**Figura 7** – API *Listeria* com perfil da espécie *L. monocytogenes*

O API 20E é também um sistema de identificação padronizado, mas neste caso, para géneros da família *Enterobacteriaceae* e outras bactérias Gram negativas. Os diferentes testes na galeria apresentam-se também na forma desidratada, compreendendo neste caso 20 testes. A leitura é de igual modo realizada através de um quadro de leitura (Anexo 27) e a identificação obtém-se consultando o sistema de identificação on-line ([http://www.fmed.uc.pt/bedel\\_files/praticas0708.pdf](http://www.fmed.uc.pt/bedel_files/praticas0708.pdf)).

### **3.3.14 – Meios utilizados para preparação do inoculo de *Listeria monocytogenes***

Para simular a contaminação das saladas com *L. monocytogenes*, foram realizados ensaios preliminares utilizando os meios *Columbia Agar* com 5% *Horse Blood* (COH) (bioMerieux® SA, Marcy L'Étoile, França) (Anexo 28) e *RAPID' Listeria spp./Agar* (Bio-Rad™, Marne-la-Coquette, França) (Anexo 29).

O meio *RAPID' Listeria spp./Agar* é um meio cromogénico selectivo para isolamento e identificação presuntiva de todas as espécies de *Listeria* ([www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)). O sistema de identificação é idêntico ao descrito no ponto 3.3.4.

## **3.4 – Métodos utilizados nas análises microbiológicas**

Quando se efectuam análises microbiológicas a géneros alimentícios é fundamental garantir que não ocorra contaminação das amostras por microrganismos presentes no ambiente, bem como, que o ambiente não seja contaminado pelos microrganismos presentes na amostra. Outro aspecto importante prende-se com a validação dos métodos microbiológicos, sendo de extrema importância assegurar que as regras gerais utilizadas na execução destes ensaios são as mesmas em todos os laboratórios, ajudando assim a obter resultados comparáveis e contribuindo para a segurança dos técnicos de laboratório, prevenindo riscos de infecção. Deste modo e tendo em conta estes objectivos, no decorrer dos ensaios analíticos referentes a este trabalho, foram respeitadas as Boas Práticas de Laboratório e os requisitos constantes na norma ISO 7218:2007.

### **3.4.1 – Transporte e recepção das amostras**

As saladas adquiridas para realização deste trabalho de investigação foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) em mala térmica, a uma temperatura entre 1°C e 8°C, monitorizada regularmente com uma sonda Tomprobe (Réf. MD30100. AES Laboratoires<sup>TM</sup>, Rennes, França) (Anexo 30), num período máximo de 30 minutos após aquisição.

Ao chegarem ao laboratório as embalagens de origem foram recepcionadas, identificadas e armazenadas em frigorífico, a temperatura controlada ( $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), até ao momento de realização das análises (no espaço de tempo mais curto possível e sempre antes do final do seu prazo de validade). A recepção e identificação foram efectuadas através da atribuição de um número de amostra, de modo a assegurar o seu acompanhamento até à saída do resultado final, registando-se sempre as seguintes informações: data de compra, local de aquisição, marca, variedade, lote de fabrico e prazo de validade.

### **3.4.2 – Método utilizado na colheita das tomas de amostras**

As tomas de amostra foram colhidas respeitando criteriosamente as regras de assepsia. As embalagens de origem foram desinfectadas com o auxílio de algodão embebido em álcool a 70% e posteriormente foram cortadas com o auxílio de uma tesoura esterilizada, tendo este procedimento sido efectuado num raio de 15 cm da chama do bico de Bunsen. Foram então colhidas, com o auxílio de uma pinça esterilizada (Figura 8) três tomas das amostras para sacos esterilizados próprios para “Stomacher” (PE dim 177x304 mm com tela filtrante, Seward Limited, London, UK) devidamente identificados com o número da amostra, data e hora da colheita e referência do ensaio ao qual se destinava. (Quadro 3).



**Figura 8** – Operação de toma de amostras para realização dos ensaios

**Quadro 3** – Peso das tomas das amostras de acordo com o ensaio a efectuar

Ensaio	Toma da amostra para ensaio	Diluyente/ Meio de cultura utilizado
- Contagens em placa - Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	27 g *	BPW
- Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	25 g **	cF-d
- Pesquisa de <i>E. coli</i> O157	25 g ***	mTSB+N

\* 1ª toma; \*\* 2ª toma; \*\*\* 3ª toma

### 3.4.3 – Método utilizado na diluição de tomas de amostras

Dado que este trabalho foi realizado com alimentos sólidos procedeu-se a uma etapa inicial de preparação da amostra com efectivação de uma suspensão inicial (diluição primária), que tem por finalidade transformar a heterogeneidade de uma amostra sólida, numa amostra líquida, homogénea e representativa do alimento a analisar. O objectivo será obter uma distribuição o mais homogénea possível dos microrganismos contidos nos componentes sólidos da amostra. Posteriormente foram preparadas diluições decimais sucessivas, de modo a reduzir o número de microrganismos por unidade de volume semeado e permitir assim efectuar uma contagem de ufc, após o período de incubação, conforme descrito em cada norma específica utilizada. Estes procedimentos foram efectuados de acordo com as regras preconizadas na norma ISO 6887-1:1999.

Com a 1ª toma da amostra, recorrendo ao diluidor automático com balança (“Pinch Diluter” Refº 7577 - bioMerieux® SA, Marcy L’Étoile, França) (Figura 9), foi efectuada uma diluição inicial (p/p) da amostra na proporção 1/10 usando como diluente o meio BPW (suspensão inicial). A suspensão assim preparada foi usada para as contagens de microrganismos e simultaneamente como pré-enriquecimento para pesquisa de *Salmonella* spp.

A 2ª toma foi pesada em balança digital PM2000 – Mettler (Mettler Instrumente, Zurique, Suíça), sendo-lhe posteriormente adicionado cF-d igualmente na proporção de 1/10, constituindo o enriquecimento primário para a pesquisa de *L. monocytogenes*.

A 3ª toma, de modo idêntico, foi pesada na referida balança digital e usada para a pesquisa de *E. coli* O157 tendo sido adicionada de 225 mL de mTSB+N.

Todas estas misturas foram homogeneizadas no aparelho “Stomacher®” (Stomacher 400 “Circulator”, Seward Limited, London, UK) (Figura 10), durante 1 minuto, a 230 rpm.



**Figura 9** – Diluidor automático com balança; **Figura 10** - Stomacher

#### **3.4.4 – Métodos utilizados na pesquisa e contagem de microrganismos psicotróficos, *Enterobacteriaceae* e patogénicos**

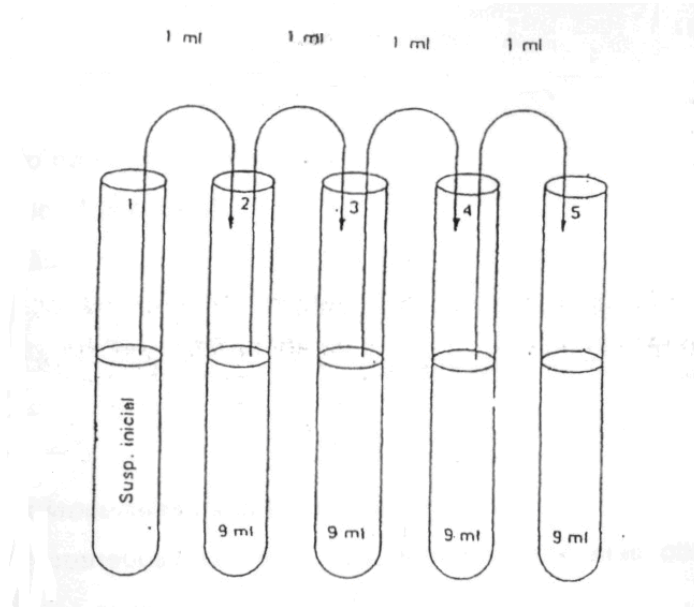
Para a estimativa da flora microbiana e potenciais patogénicos realizaram-se vários ensaios que se encontram resumidos no Quadro 4.

**Quadro 4 – Ensaio realizados para avaliação microbiológica**

<b>Microrganismos</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Diluições</b>	<b>Método/ Inoculo</b>	<b>Tempo de incubação</b>	<b>Temperatura de incubação</b>
Aeróbios Psicrotróficos	PCA	10 <sup>-2</sup> a 10 <sup>-6</sup>	1ml – por incorporação	10 dias	6,5°C
<i>Enterobacteriaceae</i>	VRBG	10 <sup>-2</sup> a 10 <sup>-5</sup>	1ml – por incorporação/camada dupla	24h	37° C
<i>E. coli</i>	TBX	10 <sup>-1</sup>	1ml – por incorporação	24h	44° C
<i>L. monocytogenes</i>	ALOA/O AA	10 <sup>-1</sup>	0,1ml – por espalhamento, após 1h/temperatura ambiente	48h	37° C
<i>A. hydrophila</i>	Ryan	10 <sup>-1</sup> e 10 <sup>-2</sup>	0,1ml – por espalhamento	24h	30° C
<i>C. perfringens</i>	TSC	10 <sup>-1</sup>	1ml – por incorporação/camada dupla	24h	37°C (anaerobiose)
<i>B. cereus</i>	Mossel	10 <sup>-1</sup>	0,1ml – por espalhamento	48h	37° C

#### 3.4.4.1 – Método utilizado na preparação das diluições decimais

Fizeram-se diluições decimais sucessivas até à diluição  $10^{-6}$ , com base no nível de contaminação esperado. Esta metodologia consiste em adicionar 1 mL da suspensão inicial a 9 mL de TS preparando assim a diluição  $10^{-2}$ . A partir desta, é preparada de igual modo a diluição  $10^{-3}$  e assim sucessivamente até à  $10^{-6}$  (Figura 11).



**Figura 11** – Esquema de diluições sucessivas (adaptado de Pampulha e Oliveira, 2004/2005)

#### 3.4.4.2 – Método utilizado na contagem de microrganismos psicrotróficos

Para a contagem total dos microrganismos psicrotróficos foi seguida uma metodologia baseada na norma ISO 1741:2001. Este método consiste em semear 1 mL das diluições consideradas necessárias de modo a obter placas contáveis (neste caso usámos da diluição  $10^{-2}$  à diluição  $10^{-6}$ ) por incorporação em meio PCA. As placas inoculadas, após solidificação, foram invertidas e incubadas a  $6,5^{\circ}\text{C}$  durante 10 dias. Após o período de incubação foram seleccionadas as placas contáveis, ou seja, aquelas que continham menos de 300 colónias, sendo nestas placas contadas todas as colónias desenvolvidas, tanto à superfície como no interior do agar. No processo de contagem em placa (manual) foram consideradas todas as colónias presentes, independentemente da sua morfologia. Neste método foi utilizado um meio de cultura não selectivo, de forma a não ocorrer qualquer tipo de inibição do crescimento de

microrganismos, isto é, de forma a permitir o desenvolvimento de todos os microrganismos viáveis capazes de se multiplicarem nas condições de ensaio.

#### **3.4.4.3 – Métodos utilizados na contagem de *Enterobacteriaceae***

A contagem das bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, foi realizada seguindo a norma ISO 21528-2:2004b, que preconiza a utilização do meio VRBG, semeado por incorporação com 1 mL de inóculo, em camada dupla, incubando as placas a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante  $24 \pm 2$  h. Nestes ensaios foram semeados inóculos correspondentes às diluições  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ .

Para confirmação das colónias presuntivas, foi feita a avaliação quanto à produção de oxidase e à fermentação da glucose.

#### **3.4.4.4 – Método utilizado na contagem de *Escherichia coli***

A contagem de *E. coli* foi efectuada seguindo a norma ISO 11649-2:2001. Este procedimento consistiu na inoculação de 1 mL das diluições consideradas necessárias (neste caso usámos a diluição  $10^{-1}$ ), por incorporação, utilizando o meio TBX, com incubação até um máximo de 24 h a  $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

As estirpes das amostras que se revelaram positivas, apresentando colónias com coloração azul, como referido em 3.3.3, foram enviadas para a Unidade de Enterobactérias do INSA, para detecção de factores de patogenicidade pelo método de *Polimerase Chain Reaction* (PCR) multiplex.

#### **3.4.4.5 – Métodos usados na contagem de *Listeria monocytogenes***

Na contagem de *Listeria* spp. foi seguida a metodologia descrita na norma ISO 11290-2:1998/ Amd.1:2004. O procedimento compreende a incubação da suspensão inicial ( $10^{-1}$ ) a  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  durante  $1\text{ h} \pm 5\text{ min}$ . Após o período de incubação inoculou-se o meio de cultura ALOA, com 0,1 mL das diluições consideradas necessárias

(neste caso, apenas a diluição  $10^{-1}$ ) por espalhamento em superfície. A incubação foi feita a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 24 h e, se necessário, foi mantida por mais 24 h, até um máximo de 72 h. As colónias azuis, presuntivas de *Listeria* spp. foram passadas para TSA. A partir das colónias assim obtidas efectuou-se o teste da catalase e a todas as colónias positivas neste teste foi realizada a caracterização bioquímica por API *Listeria*.

#### **3.4.4.6 – Métodos utilizados na contagem de *Clostridium perfringens***

A contagem de *C. perfringens* foi efectuada seguindo a norma ISO 7937:2004. Este procedimento consistiu na inoculação de 1 mL das diluições consideradas necessárias (neste caso usámos a diluição  $10^{-1}$ ), por incorporação, em camada dupla, utilizando o meio TSC, com incubação durante 24 h a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , em jarra de anaerobiose.

#### **3.4.4.7 – Métodos utilizados na contagem de *Aeromonas hydrophila***

Para a contagem de *A. hydrophila* foi seguida a metodologia preconizada pela *Health Protection Agency* (HPA/ Colindale, U.K.). Neste procedimento foram semeados 0,1 mL das diluições consideradas necessárias (usámos as diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ), por espalhamento à superfície em gelose Ryan, sendo as placas incubadas à temperatura de  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 18 a 24 h. As colónias presuntivas, verdes escuras, opacas e com a zona central mais escura, lidas por comparação com a estirpe padrão cultivada nas mesmas condições, foram isoladas (um mínimo de 3 colónias por placa) em meio TSA. A partir dos isolados assim obtidos foi efectuado o teste da oxidase. Nos casos que revelaram a presença desta enzima foram efectuados os seguintes testes bioquímicos de diagnóstico: glucose, Voges-Proskauer (VP), lisina, arginina, ornitina, manitol e inositol.

Posteriormente foram efectuados testes bioquímicos miniaturizados para identificação de bactérias Gram negativas (API 20E) a partir de todas as culturas isoladas que revelaram resultados nos testes de diagnóstico coincidentes com os apresentados no Quadro 5

**Quadro 5** – Testes bioquímicos de diagnóstico para identificação de *A. hydrophila*  
(adaptado de Adderson *et al.*, 1997)

	Gás na glucose	V.P.	Lisina	Arginina	Ornitina	Manitol	Inositol
Resultado	+	+	+	+	-	+	-

#### 3.4.4.8 – Métodos utilizados na contagem e pesquisa de *Bacillus cereus*

Para a contagem de *B. cereus*, foi utilizada a metodologia apresentada na norma ISO 7932:2004. Isto é, inoculou-se 0,1 mL das diluições consideradas necessárias, (neste caso, da suspensão inicial,  $10^{-1}$ ) por espalhamento à superfície, no meio Mossel em placa. As placas assim obtidas foram incubadas a  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 48 h.

A pesquisa de *B. cereus* foi feita a partir de um enriquecimento prévio em BPW a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 16 a 20 h. Posteriormente, foi feito o isolamento, com ansa à superfície do meio acima referido e incubado nas mesmas condições.

Sempre que surgiram colónias grandes, crenadas, de cor rosa e rodeadas por um halo opaco, ou seja, colónias características, quer na contagem, quer na pesquisa, foi feita a confirmação. Esta confirmação consistiu na pesquisa da actividade hemolítica em meio COS, e sempre que necessário, na detecção de lecitinase. Esta última pesquisa foi feita quando nas placas iniciais, as colónias suspeitas se encontravam coalescentes com outros microrganismos contaminantes, impossibilitando a visualização da produção desta enzima.

#### 3.4.4.9 – Métodos utilizados na pesquisa de *Salmonella* spp., de *Listeria monocytogenes* e de *Escherichia coli* O157

As pesquisas de *Salmonella* spp., de *L. monocytogenes* e de *E. coli* O157 foram realizadas utilizando o método imunoenzimático - VIDAS®. É um método que se baseia na tecnologia Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA) para a pesquisa de microrganismos patogénicos presentes nas amostras sujeitas a ensaio. Permite indicar

a presença ou ausência destes microrganismos, comparando o resultado com a recta de calibração, previamente introduzida no aparelho mini-VIDAS. Aquando da abertura de um novo “kit” mini-VIDAS (bioMérieux® SA, Marcy L'Étoile, França) (Figura 12) introduziu-se o respectivo código de barras. Do “kit” de utilização fazem parte os cones, que servem de fase sólida e de sistema de pipetagem para o teste. Os cones encontram-se revestidos interiormente por anticorpos monoclonais (ou policlonais consoante o microrganismo) específicos para o agente microbiano em pesquisa. Os restantes reagentes necessários à reacção imunológica encontram-se repartidos na “barrete” (Figura 13). Se o microrganismo alvo estiver presente na amostra, ocorrerá reacção antigénio-anticorpo, e posteriormente, pela adição de um conjugado (anticorpo ligado a fosfatase alcalina), bem como de um substrato contendo o fluorocromo 4-Metil-umbeliferil fosfato, que permitirá a emissão de fluorescência, sendo esta detectada pelo sistema VIDAS.



**Figura 12** - Aparelho mini-VIDAS; **Figura 13** - Barrete e cone mini-VIDAS

#### **3.4.4.9.1 – Método utilizado na pesquisa de *Salmonella* spp.**

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., foi efectuado um pré-enriquecimento em BPW, com incubação durante 16 a 20 horas, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após este período de incubação, foi feito o enriquecimento selectivo, inoculando-se 0,1 mL em RVS-T e 1 mL em MKTTn-T, que foram incubados, respectivamente, a  $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 6 a 8 horas. Posteriormente, efectuou-se um pós-enriquecimento sendo retirado 1 mL do crescimento em RVS-T que se inoculou no meio M, e 0,1 mL do crescimento em MKTTn-T que se inoculou num outro tubo, do referido meio M. A incubação de ambos os tubos contendo o meio M foi feita a  $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 16 a 20 h. Após o período de incubação, retirou-se 1 mL de cada tubo do meio M e colocou-se num tubo estéril, sujeitando-se à temperatura de 95 a 100  $^{\circ}\text{C}$ , durante 15 min ( $\pm 1$

min). Após arrefecimento do tubo (operação que não deve ultrapassar os 30 min), colocou-se 500 µL da suspensão na “barrete” contendo os reagentes do “kit” VIDAS SLM, colocando a mesma no aparelho mini VIDAS®. Os casos que revelaram resultados positivos foram sujeitos a testes de confirmação e identificação, procedendo-se do seguinte modo: de cada um dos meios de enriquecimento selectivo e pós enriquecimento retirou-se uma alíquota com o auxílio de uma ansa descartável, que se inoculou, pela técnica das estrias, na superfície dos dois meios de cultura selectivos sólidos, XLD e SM2. Estas placas foram incubadas a 37 °C ± 1 °C durante 24 ± 3 h. As colónias características de *Salmonella* spp. foram inoculadas, por picada central, no meio de diagnóstico, TSI, incubado a 37 °C ± 1 °C durante 24 ± 2 h, e simultaneamente, em placas de meio TSA (incubadas a 37 °C ± 1 °C durante 24 ± 2 h) para efectuar testes bioquímicos miniaturizados de identificação de bactérias Gram negativas, API 20E.

#### **3.4.4.9.2 – Método utilizado na pesquisa de *Listeria monocytogenes***

No caso da pesquisa de *L. monocytogenes* fez-se inicialmente um primeiro enriquecimento selectivo durante 24 a 26 h em cF-d, a uma temperatura de 30 °C ± 1 °C. Depois da incubação, efectuou-se uma passagem de 1 mL para caldo Fraser (segundo enriquecimento selectivo) que foi colocado na estufa a 37 °C ± 1 °C durante 24 a 26 h. Após este período, foram inoculados 500 µL na “barrete” contendo os reagentes do “kit” VIDAS LMO2, sendo esta colocada no aparelho mini VIDAS® para realização do ensaio. Os casos que se revelaram positivos foram sujeitos a confirmação, seguindo a mesma metodologia descrita em 3.3.4.5..Para tal, a partir do crescimento em meio Fraser, com auxílio de uma ansa descartável foi efectuado o isolamento em meio sólido ALOA. As colónias presuntivas de *L. monocytogenes* foram depois passadas para meio TSA, sendo posteriormente sujeitas ao teste de pesquisa de catalase, API *Listeria* e teste de hemólise em meio COS.

#### **3.4.4.9.3 – Método utilizado na pesquisa de *Escherichia coli* O157**

Para a pesquisa de *E. coli* O157 foi realizado um primeiro enriquecimento selectivo em m-TSB+N à temperatura de 41,5 °C ± 1 °C por 6 a 7 h. A partir deste enriquecimento passou-se uma alíquota de 1 mL para caldo CT-MacConkey, fazendo-se assim um enriquecimento selectivo, que foi incubado durante 18 ± 1 h a 37 °C ± 1 °C. No fim desta etapa retiraram-se 2 mL do caldo referido para um tubo estéril que foi sujeito a

um aquecimento entre 95 °C a 100 °C durante 15 min ( $\pm$  1 min). Depois do tubo arrefecido (operação que não deverá exceder os 30 min), colocaram-se 500  $\mu$ L na “barrete” contendo os reagentes do “kit” VIDAS *E. coli* O157 ECO, a qual foi colocada no aparelho mini VIDAS<sup>®</sup> para realização do ensaio. Os casos que se revelaram positivos foram sujeitos a testes de confirmação e identificação. Assim, a partir do meio CT-MacConkey, com o auxílio de uma ansa descartável, foi efectuado o isolamento nos meios sólidos CT-SMAC e O157 H7 ID-F.

Nos casos em que os testes de confirmação não se revelaram coincidentes com o resultado obtido no mini-VIDAS, realizou-se a concentração selectiva de *E. coli* O157 através do método de separação imunomagnética, utilizando para o efeito o “kit” Dynabeads<sup>®</sup> anti - *E. coli* O157 através do método de referência. Assim, retirou-se o prato magnético do aparelho Dynal Magnetic Particle Concentrator<sup>®</sup> MPC-S (Dynal Biotech ASA, Oslo, Noruega) e colocaram-se os tubos de microcentrifugação de 1,5 mL (em número igual ao número de amostras) no referido aparelho. Resuspendeu-se o Dynabeads anti - *E. coli* O157 no Vortex (Vortex-Genic, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA) e colocou-se 20  $\mu$ L em cada um dos tubos, adicionando-se posteriormente 1 mL do meio CT-MacConkey utilizado anteriormente. Após fecho dos tubos, inverteu-se o Dynal MPC-S constantemente durante 10 min e inseriu-se novamente o prato magnético no aparelho, inverteu-se novamente o Dynal MPC-S várias vezes, com o objectivo de concentrar as esferas numa das paredes do tubo (isto é, na parede que se encontrava encostada ao prato magnético). Depois de atingido este objectivo, os tubos foram abertos e retiradas as amostras sobrenadantes. Retirou-se novamente o prato magnético e adicionou-se a cada tubo 1 mL de tampão de lavagem, fechando-se os tubos novamente e invertendo-se o Dynal MPC-S para resuspensão das esferas. Após resuspensão tornou-se a colocar o prato magnético no aparelho e inverteu-se novamente de forma contínua, tendo este procedimento a finalidade de concentrar as esferas e tal como na fase anterior retirar o liquido sobrenadante dos tubos. Adicionou-se novamente 1 mL de tampão de lavagem a cada tubo e inverteram-se novamente para resuspensão das esferas. Repetiu-se o procedimento acima indicado uma terceira vez até chegada à fase de nova retirada de sobrenadante. Por fim, retirou-se o prato magnético do Dynal MPC-S e resuspendeu-se o complexo Dynabeads-Bactéria em 100  $\mu$ L de tampão de lavagem sob agitação no Vortex. Após esta fase de separação imuno-magnética (IMS), inoculou-se 0,1 mL da suspensão obtida nos meios sólidos CT-SMAC e O157 H7 ID-F, sendo os meios incubados nas condições anteriormente referidas.

As estirpes isoladas foram posteriormente ensaiadas para a pesquisa de factores de patogenicidade, a qual se efectuou com recurso a testes de biologia molecular, na Unidade de Enterobactérias do INSA, como já referido em 3.4.4.4.

#### **3.4.4.10 – Método utilizado na pesquisa da toxina diarreica de *Bacillus cereus***

Para pesquisa de toxina diarreica de *B. cereus* foi seguido o procedimento descrito na bula apenas ao “kit” de detecção de toxinas BCET-RPLA, sendo seguida a metodologia referente à pesquisa em fluidos de cultura. Para tal, inoculou-se uma colónia isolada em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid™, Basingstone, Hampshire, UK) (Anexo 31) que se incubou a 37 °C ± 1 °C durante 18 h. A cultura assim obtida, foi centrifugada durante 20 min a uma velocidade de 900 g (Centrifuga KS-8000, Kubota Corporation, Osaka, Japão). Entretanto, preparou-se uma micro placa de forma a que cada fila tivesse 8 poços e cada 2 filas correspondessem a uma amostra. Distribuiu-se 25 µL de diluente em cada poço das 2 filas, excepto no primeiro poço. Adicionou-se 25 µL da amostra aos 1º e 2º poços de ambas as filas. Posteriormente, iniciando no 2º poço de cada fila, fizeram-se diluições, transferindo sucessivamente 25 µL de cada amostra, e deixou-se o ultimo poço apenas com diluente. A cada um dos poços da primeira fila adicionaram-se 25 µL de látex sensibilizado e a cada um dos poços da segunda fila adicionaram-se 25 µL de controlo de látex. Agitou-se manualmente a placa, cobriu-se para evitar a evaporação e incubou-se em local livre de vibrações, à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C, neste laboratório) e durante 24 h.

### **3.5 – Contaminação das saladas com *Listeria monocytogenes***

#### **3.5.1 - Preparação e determinação do inoculo a utilizar com *Listeria monocytogenes***

Com o objectivo de definir a quantidade de *L. monocytogenes* (g/mL) a utilizar para contaminação das saladas, de forma a obter contagens em placa da ordem de 10<sup>2</sup> a

$10^4$  ufc/g, realizou-se o seguinte procedimento: Isolou-se uma colónia de *L. monocytogenes* e colocou-se em 9 mL de triptona sal e realizaram-se diluições decimais sucessivas até à diluição  $10^{-8}$ . Inoculou-se por espalhamento 0,1 mL de cada uma das diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em meios COH e em placas de RAPID' Listeria spp./Agar e colocaram-se na estufa a  $37^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  h.

Os resultados obtidos (Quadro 6) foram da mesma ordem de grandeza para os dois meios utilizados.

**Quadro 6** - Contagens de *L. monocytogenes* em RAPID'Listeria spp. (i) e COH (ii)

Diluição	(i)	(ii)
$10^{-1}$	Inc.*	Inc.
$10^{-2}$	Inc.	Inc.
$10^{-3}$	Inc.	Inc.
$10^{-4}$	Inc.	Inc.
$10^{-5}$	Inc.	144
$10^{-6}$	17	12
$10^{-7}$	0	3
$10^{-8}$	0	0

\* Inc. - Incontável

Por isso decidimos utilizar como base para os cálculos, as contagens obtidas nas placas de RAPID' Listeria spp.

Diluição  $0,1 \times 10^{-6}$  —————  $1,7 \times 10^1$  colónias

Diluição **X** —————  $1,7 \times 10^3$  colónias

Logo, a diluição **X** = 0,1 mL da diluição  $10^{-4}$ , o que é equivalente a 1 mL da diluição  $10^{-3}$ .

Desta forma concluiu-se que para obter um nível de contaminação entre  $10^2$  e  $10^4$  ufc, seria necessário contaminar com 1 mL de uma diluição de  $10^{-3}$  de *L. monocytogenes* cada 10 g de amostra da salada a usar no ensaio.

### 3.5.2 – Objectivo da contaminação

Para avaliação da capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* em saladas conservadas no frigorífico, foram contaminadas 27 das 67 amostras analisadas. Depois de realizadas as análises microbiológicas acima referidas, foram retiradas duas aliquotas de 10 g cada para serem contaminadas com as duas estirpes de *L. monocytogenes* referidas em 3.1. Após contaminação foram efectuadas contagens de *L. monocytogenes*, uma de imediato e outra após conservação no frigorífico até ao final do prazo de validade inscrito nas embalagens das saladas.

Assim, isolou-se uma colónia de *L. monocytogenes* para um tubo contendo 9 mL de triptona sal (Diluição mãe – Diluição  $10^{-1}$ ). Realizaram-se duas diluições decimais da suspensão mãe, obtendo-se uma diluição de  $10^{-3}$  de *L. monocytogenes*.

As duas porções de 10 g da salada pesadas foram colocadas em sacos próprios para Stomacher (Seward Limited, London, U.K.). Seguidamente, no interior de uma câmara de segurança biológica (Microflow 20134, Andover, UK) contaminou-se cada uma das tomas de salada com 1 mL da diluição de  $10^{-3}$  de *L. monocytogenes* anteriormente preparada, sendo posteriormente homogeneizada em Stomacher (Stomacher 400 “Circulator”, Seward Limited, London, UK). Um dos sacos foi armazenado à temperatura de refrigeração ( $\pm 7^{\circ}\text{C}$ ), com o propósito de simular as condições de armazenamento em frigorífico de saladas MP, após abertura, em casa dos consumidores. Ao outro saco foram adicionados 90 mL de BPW (Diluição mãe – Diluição  $10^{-1}$ ), o qual foi homogeneizado novamente em Stomacher, ficando de seguida em repouso durante  $1\text{ h} \pm 5\text{ min}$ . Esta etapa inicial de enriquecimento é quase sempre usada para facilitar a recuperação de organismos lesados que podem ser encontrados em amostras de alimentos (Fröder, 2005). Após este período, realizaram-se diluições decimais de cada uma das amostras das saladas contaminadas até à diluição  $10^{-3}$  e inoculou-se por espalhamento 0,1 mL de cada uma destas diluições em meio ALOA, sendo posteriormente colocadas na estufa durante 48h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

No último dia do prazo de validade da salada, a amostra colocada em refrigeração foi retirada. Tal como na amostra de salada colhida na mesma altura, adicionaram-se 90 mL de BPW para preparação da diluição mãe e repetiu-se o procedimento anteriormente realizado com a outra amostra de salada analisada.

De acordo com a norma ISO 7218:2007, o manuseamento deste microrganismo foi sempre realizado em câmara de fluxo laminar (Figura 14) e respeitando todos os procedimentos de segurança exigidos ao nível de contenção biológico correspondente (Nível 2).



**Figura 14** – Contaminação das saladas em câmara de fluxo laminar

### **3.6 – Análise sensorial**

Com a finalidade de avaliar as alterações sensoriais que as saladas experimentam desde o dia da compra até ao dia indicado no prazo de validade, foi realizada uma prova de comparação pareada, isto é, uma prova em que se avalia se duas amostras são diferentes entre si e quando consideradas diferentes, qual a dimensão da diferença.

A prova de comparação pareada foi realizada por um painel de provadores treinado no Laboratório de Estudos Técnicos (LET) do Instituto Superior de Agronomia (ISA). A sala de prova foi mantida sob condições adequadas para a realização da mesma, como especificado no ponto 2.5.

As saladas foram mantidas nas embalagens originais sob refrigeração, isto é, a uma temperatura de  $\pm 7$  °C. No dia de realização das provas foram acondicionadas em mala térmica a uma temperatura entre 1 °C e 8 °C, para transporte até ao LET.

As amostras foram servidas em copos de plástico descartáveis, encontrando-se estes codificados com algarismos aleatórios de 3 dígitos. Foram posicionadas ao acaso, e oferecidas aos provadores duas a duas, sem que estes tenham sido informados sobre as suas características diferenciais.

As amostras pareadas pertenciam à mesma marca e variedade mas a lotes diferentes. Uma delas foi comprada no dia anterior às provas, enquanto a outra findava a sua

validade no dia da realização das mesmas. Avaliaram-se 4 pares de amostras, pertencentes à variedade César e Gourmet da marca F e à variedade Mescla e Ibéria da marca Q.

As respostas foram registadas numa ficha de provas (Anexo 32), na qual o provador deveria referir qual a dimensão da diferença verificada entre as duas amostras oferecidas simultaneamente. Numa escala de 0 a 10, onde o 0 corresponde a Sem diferença e o 10 corresponde a Extremamente diferentes.

### **3.7 – Análise de dados e tratamento estatístico**

#### **3.7.1 – Análises microbiológicas**

O programa estatístico utilizado para realização dos diagramas de extremos e quartis foi o Software R, versão portuguesa da Universidade do Porto.

Para avaliação da correlação entre diferentes dados obtidos foi utilizado o programa Microsoft Office Excel 2003.

#### **3.7.2 – Análises sensoriais**

O programa estatístico utilizado para o tratamento dos dados obtidos na análise sensorial foi o ANOVA suportado pelo software Statistica™, versão 6, de Statsoft, EUA.

ANOVA ou Análise de Variância é um conjunto de técnicas que permite analisar dados que estão dependentes de várias condições externas operando simultaneamente. Os efeitos ou condições externas que afectam os resultados de uma experiência são designados de factores (Silva, 1994). Neste trabalho os factores foram o conjunto “Marca - Variedade”.

## **4 - Resultados**

### **4.1 – Resultados da análise microbiológica**

Os resultados de todas as contagens e pesquisas realizadas ao longo deste estudo encontram-se no anexo 33.

#### **4.1.1 – Contagem de psicotróficos aeróbios totais e *Enterobacteriaceae***

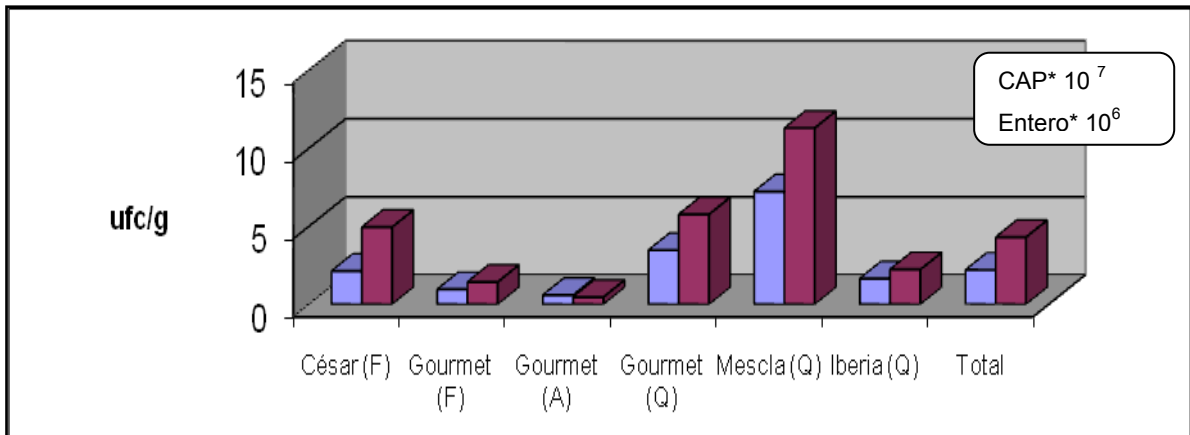
O Quadro 7, bem como a figura 15, mostram as médias das contagens de aeróbios psicotróficos bem como de *Enterobacteriaceae* para cada uma das marcas e variedades de saladas analisadas.

**Quadro 7 – Contagem de microrganismos psicrotróficos aeróbios totais e de *Enterobacteriaceae***

	Média (ufc/g)		Intervalo de contaminação (ufc/g)	
	CAP x 10 <sup>7</sup> a)	ENTERO x 10 <sup>6</sup> b)	CAP	ENTERO
<b>Salada César – Marca F</b>	2,1	4,9	[4,6 x 10 <sup>4</sup> ; 1,1 x 10 <sup>8</sup> ]	[2,0 x 10 <sup>4</sup> ; > 1,5 x 10 <sup>7</sup> ]
<b>Salada Gourmet – Marca F</b>	0,96	1,4	[1,9E+06; 2,3E+07]	[4,5 x 10 <sup>4</sup> ; 1,2 x 10 <sup>7</sup> ]
<b>Salada Gourmet – Marca A</b>	0,59	0,46	[7,5 x 10 <sup>5</sup> ; 2,1 x 10 <sup>7</sup> ]	[1,2 x 10 <sup>4</sup> ; 1,2 x 10 <sup>6</sup> ]
<b>Salada Gourmet – Marca Q</b>	3,5	5,8	[8,9 x 10 <sup>6</sup> ; 8,0 x 10 <sup>7</sup> ]	[3,2 x 10 <sup>5</sup> ; 1,3 x 10 <sup>7</sup> ]
<b>Salada Mescla – Marca Q</b>	7,2	11	[1,7 x 10 <sup>6</sup> ; >3,0 x 10 <sup>8</sup> ]	[1,5 x 10 <sup>5</sup> ; 7,2 x 10 <sup>7</sup> ]
<b>Salada Ibéria – Marca Q</b>	1,7	2,2	[1,6 x 10 <sup>5</sup> ; 7,7 x 10 <sup>7</sup> ]	[5,5 x 10 <sup>3</sup> ; 1,2 x 10 <sup>7</sup> ]
<b>Total</b>	2,2	4,3	[4,6 x 10 <sup>4</sup> ; > 3,0 x 10 <sup>8</sup> ]	[1,2 x 10 <sup>4</sup> ; > 1,5 x 10 <sup>7</sup> ]

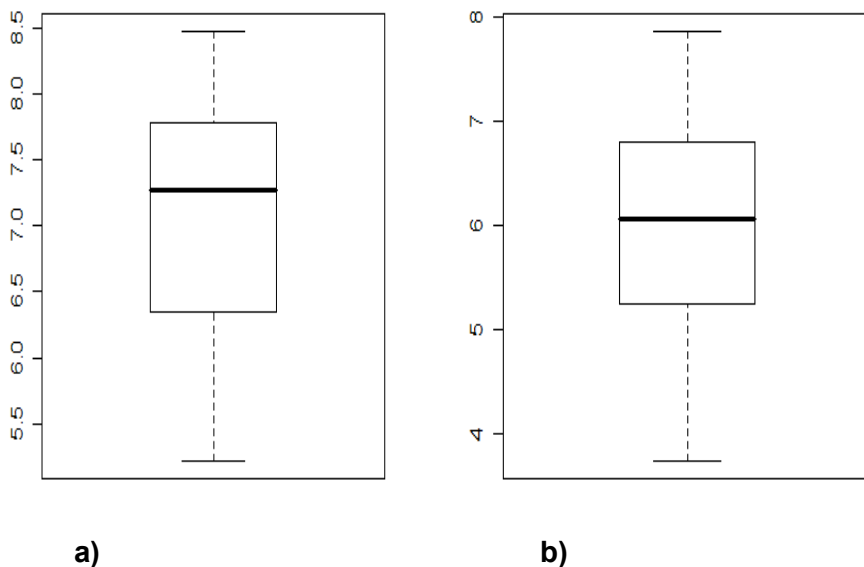
a) CAP – Contagem de aeróbios psicrotróficos totais

b) ENTERO – *Enterobacteriaceae*



**Figura 15** – Carga microbiana de psicrotróficos aeróbios totais e de *Enterobacteriaceae*

Na Figura 16 apresentam-se diagramas de extremos e quartis que nos permitem avaliar qual a localização central das contagens, outras localizações das mesmas (1º e 3º Quartil, Máximo e Mínimo), a dispersão das contagens (amplitude e distância inter-quartil) e a sua assimetria. Estes diagramas encontram-se representados para o log da contagem de psicrotróficos e log da contagem de *Enterobacteriaceae*.



**Figura 16** – Diagramas de Extremos e Quartis do logaritmo das contagens de **a)** psicrotróficos e **b)** *Enterobacteriaceae*

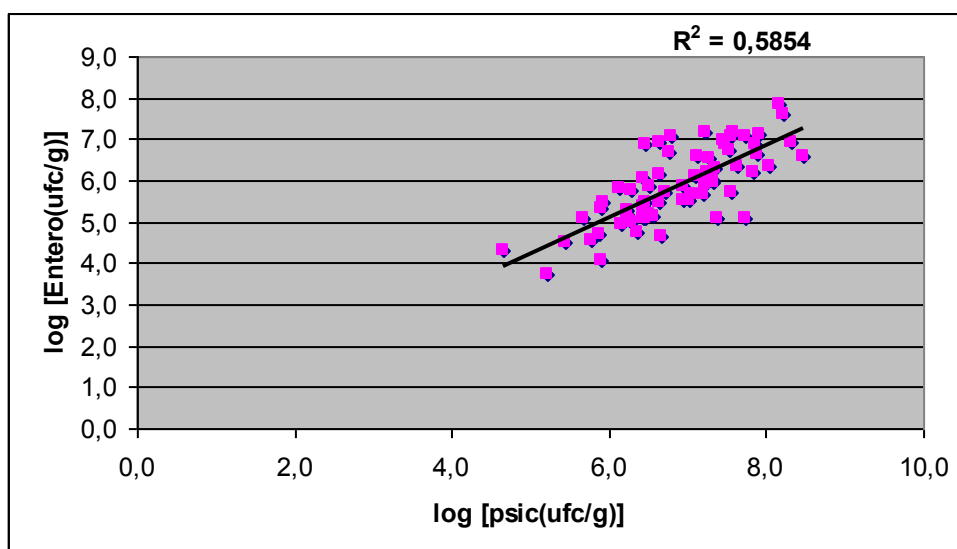
De forma a relacionar a contagem de psicrotróficos presentes nas amostras com a contagem de *Enterobacteriaceae* nas mesmas, realizou-se um gráfico x-y a partir dos valores dos log das contagens de cada um destes grupos para as amostras. Traçou-se uma linha de tendência, a partir da qual foi possível calcular o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Este indicador explica qual a percentagem de variabilidade de um factor que é causada ou explicada pela sua relação com outro factor. É calculado através da seguinte formula:

$$R^2 = \frac{S (Y_i^h - \bar{Y})^2}{S (Y_i - \bar{Y})^2} = \frac{\text{variação explicada}}{\text{variação total}}$$

Onde  $\bar{Y}$  é o valor médio dos  $Y_i$  constantes da amostra e  $Y_i^h$  é o correspondente valor estimado através da equação ( $Y_i^h = b_0 + b_1X_{1i} + b_2X_{2i} + \dots + b_kX_{ki}$ ), para o elemento  $i$  da amostra.

Este valor apresenta-se sob a forma de um valor entre 0 e 1, em que 0 corresponde à ausência de correlação entre as duas variáveis e 1 à sua total correlação. Aquando da presença de correlação, o declive da recta de tendência permite-nos saber se esta correlação é positiva ou negativa. A relação entre os dois factores ou variáveis é positivo quando o declive desta recta é também positivo, isto é, quando uma das variáveis aumenta a outra irá também aumentar. De igual modo quando uma delas diminui a outra também irá diminuir. Um declive negativo, pelo contrário, indica-nos que à medida que uma das variáveis aumenta, a outra irá diminuir e vice-versa.

Assim a Figura 17, permite-nos verificar qual o coeficiente de determinação entre estas duas variáveis e se a sua correlação é positiva ou negativa.



**Figura 17** – Relação entre a presença de psicrotróficos e *Enterobacteriaceae*

#### 4.1.2 – Contagem de *Escherichia coli*

De todas as amostras analisadas, apenas duas apresentaram contaminação com *E. coli*. Uma delas da variedade Gourmet (Marca F) e a outra da variedade Mescla (Marca Q). A primeira apresentava um nível de contaminação bastante baixo, sendo inferior a  $4,0 \times 10^1$  ufc/g, enquanto que no segundo caso o nível de contaminação foi superior,  $2,2 \times 10^2$  ufc/g. Como referido no capítulo anterior, as colónias de *E. coli* encontradas foram sujeitas a posterior confirmação na Unidade de Enterobactérias do INSA. Detectou-se que a colónia presente na primeira amostra pertencia ao grupo de patogenicidade VTEC. A 2ª amostra embora com um nível de contaminação mais elevado demonstrou ser uma estirpe de *E. coli* sem factores de patogenicidade.

#### 4.1.3 – Contagem de *Listeria* spp.

Foram encontradas 18 amostras com colónias suspeitas de pertencerem ao género *Listeria*. Após realização de API *Listeria* para identificação das espécies a que pertenciam as colónias encontradas, apenas uma delas foi identificada como *L. innocua*. Esta espécie foi encontrada numa salada da variedade Mescla da marca Q.

#### 4.1.4 – Contagem de *Aeromonas hydrophila*

Detectou-se neste estudo a presença de *A. hydrophila* em seis amostras de salada, pertencentes à marca Q, sendo quatro da variedade Ibéria e as restantes da variedade Mescla. Cinco destas amostras apresentaram uma contaminação bastante elevada, superior a  $1,5 \times 10^5$  ufc/g.

#### 4.1.5 – Contagem de *Clostridium perfringens*

Não foi encontrada a presença deste microrganismo em qualquer das amostras analisadas.

#### 4.1.6 – Contagem de *Bacillus cereus*

Entre todos os patogénicos cuja presença foi avaliada neste estudo, *B. cereus* foi aquele que foi encontrado num maior número das amostras analisadas. Na Figura 18 encontra-se representado o número de saladas contaminadas com *B. cereus*, por marca e variedade. Foram aqui considerados todos os casos em que se detectou presença de *B. cereus* tanto nas pesquisas como nas contagens.

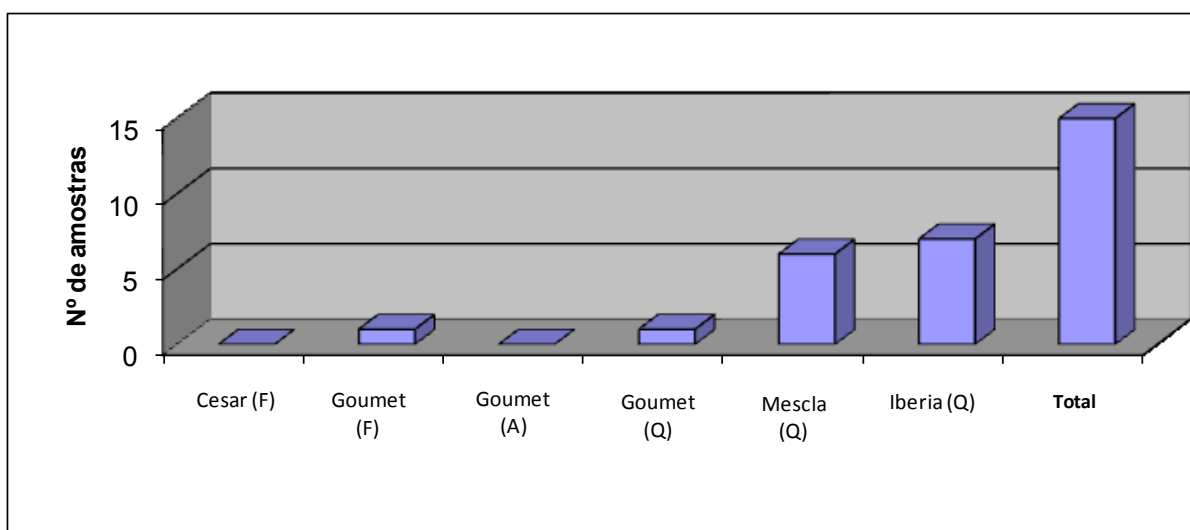
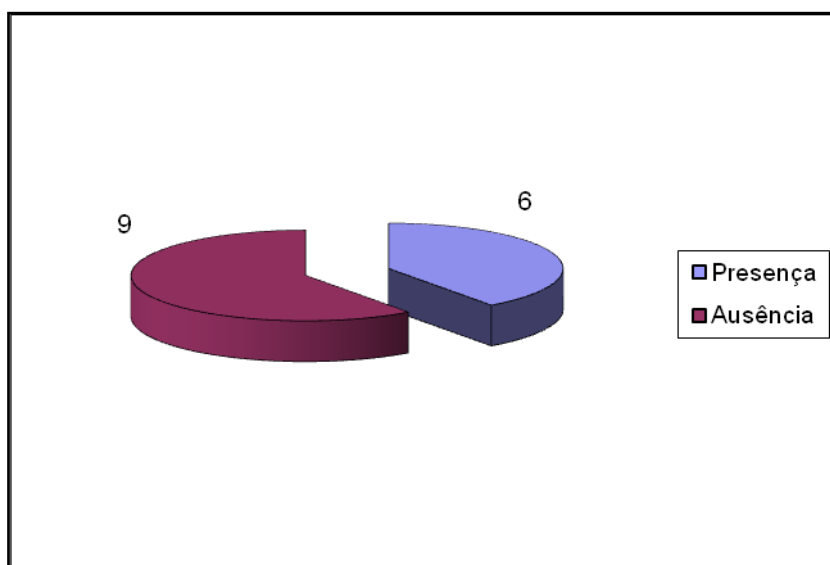


Figura 18 – Número de saladas contaminadas com *B. cereus* por marca e variedade

Todas as estirpes de *B. cereus* encontradas, foram sujeitas à pesquisa de toxina diarreica. Os resultados desta pesquisa encontram-se expressos na Figura 19, onde estão indicados o número de resultados positivos e o número de resultados negativos.



**Figura 19** – Resultados da pesquisa de toxina diarreica de *B. cereus*

#### 4.1.7 – Pesquisa de *Salmonella* spp., de *Listeria monocytogenes* e de *Escherichia coli* O157 H7

Os resultados das pesquisas realizadas no aparelho mini-VIDAS encontram-se apresentados de forma sucinta no Quadro 8.

**Quadro 8** – Resultados das pesquisas realizadas no aparelho mini-VIDAS

<i>L. monocytogenes</i>		<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i> O157 H7	
Positivos	Confirmados	Positivos	Confirmados	Positivos	Confirmados
1	1	3	0	3	0

Apenas uma das sete pesquisas que obtiveram resultados positivos foi confirmada. Esta amostra, onde se confirmou a presença de *L. monocytogenes* corresponde a uma salada da variedade Mescla pertencente à marca Q. É importante referir também que todos os resultados que deram positivos na pesquisa correspondiam a amostras desta marca.

#### 4.2 – Resultados da contaminação de saladas com *Listeria monocytogenes*

Os resultados do crescimento das duas estirpes de *L. monocytogenes* para as várias amostras estudadas encontram-se apresentados no Quadro 9. Os valores apresentados são o resultado da subtração do log do número de ufc/g contadas, no dia da contaminação, pelo log do número de ufc/g contadas no último dia do prazo de validade da mesma amostra.

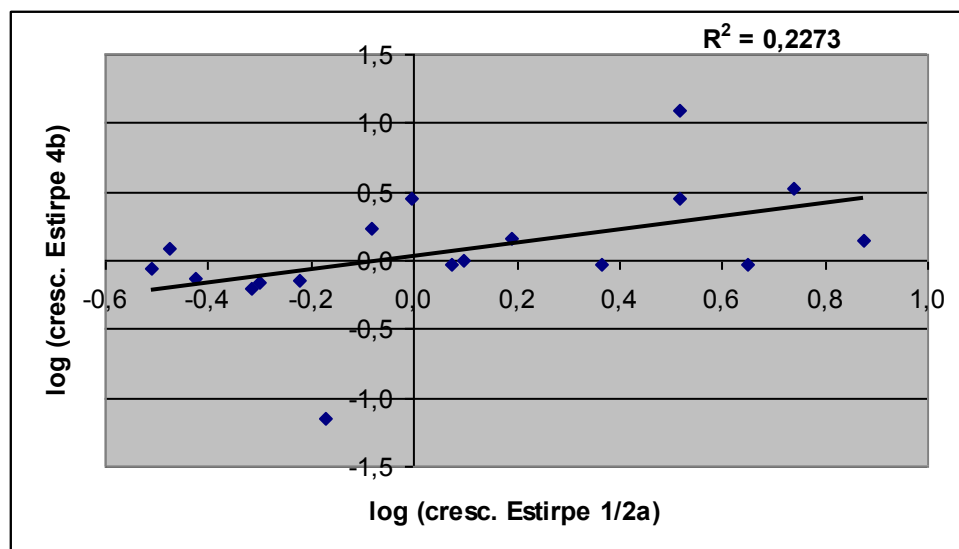
**Quadro 9** – Resultados do crescimento das duas estirpes de *L. monocytogenes* e respectivo valor médio

Crescimento = $\log(\text{ufc/g}_{t \text{ final}}) - \log(\text{ufc/g}_{t \text{ inicial}})$	
Estirpe 1/2a	Estirpe 4b
-0,152	---
-0,248	---
-0,053	---
-0,053	---
-0,263	---
-0,321	---
0,379	---
-0,195	---
-0,383	---
-0,081	0,229
0,188	0,160
0,876	0,140
0,075	-0,025
-0,172	-1,152
s.c.	0,421
s.c.	0,486
s.c.	0,658
s.c.	0,290
-0,222	-0,151
-0,512	-0,058
-0,315	-0,204

0,517	0,450
0,737	0,531
0,097	0,003
-0,301	-0,158
-0,477	0,086
-0,426	-0,126
-0,004	0,459
0,364	-0,027
0,651	-0,022
0,516	1,087
<b>Valor Médio</b>	
<b>-0,020</b>	<b>0,140</b>

s.c. – sem crescimento

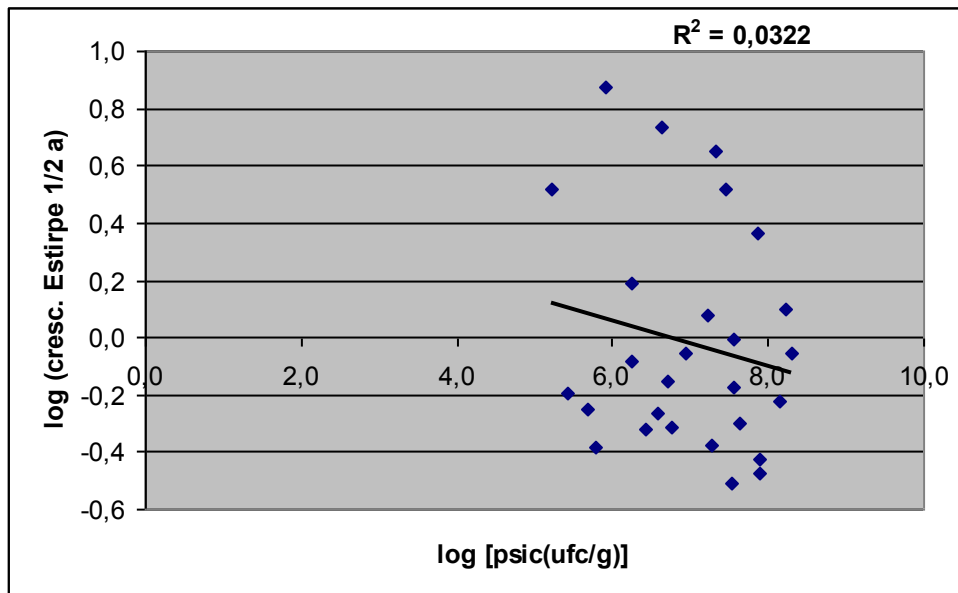
Para verificar se há correlação entre o crescimento das duas estirpes de *L. monocytogenes* nas amostras, foi realizado um gráfico que apresenta a linha de tendência e o coeficiente de determinação (Figura 20), onde a variável x corresponde ao crescimento da estirpe 1/2a e a variável y corresponde ao crescimento da estirpe 4b.



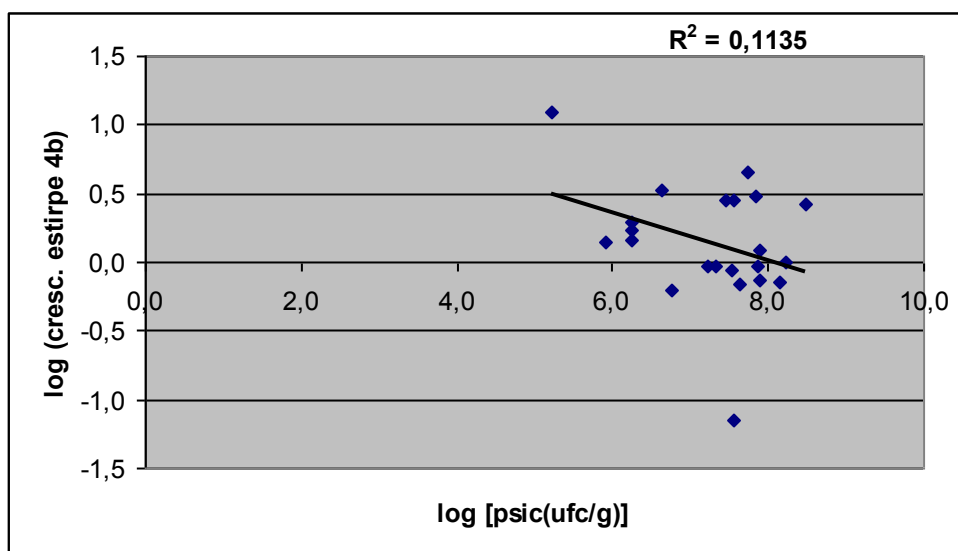
**Figura 20** – Relação entre o crescimento de *L. monocytogenes* 1/2a e 4b

O maior ou menor crescimento de *L. monocytogenes*, pode ser influenciado pela carga microbiana presente nas saladas antes da sua contaminação. Para avaliar esta

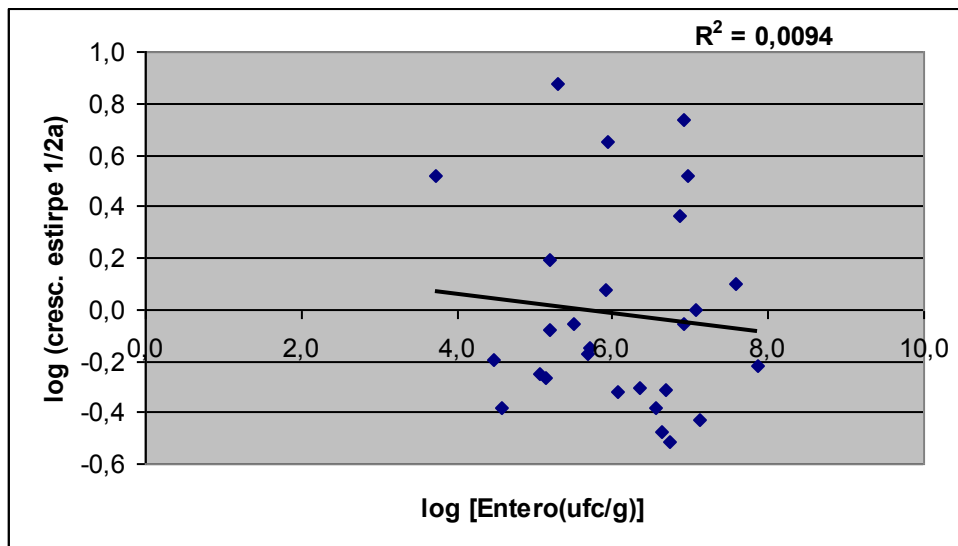
relação foram realizados gráficos, semelhantes ao acima apresentado, avaliando a relação entre o crescimento das duas estirpes de *L. monocytogenes* e a presença de psicrotróficos e *Enterobacteriaceae* (Figura 21, 22, 23 e 24).



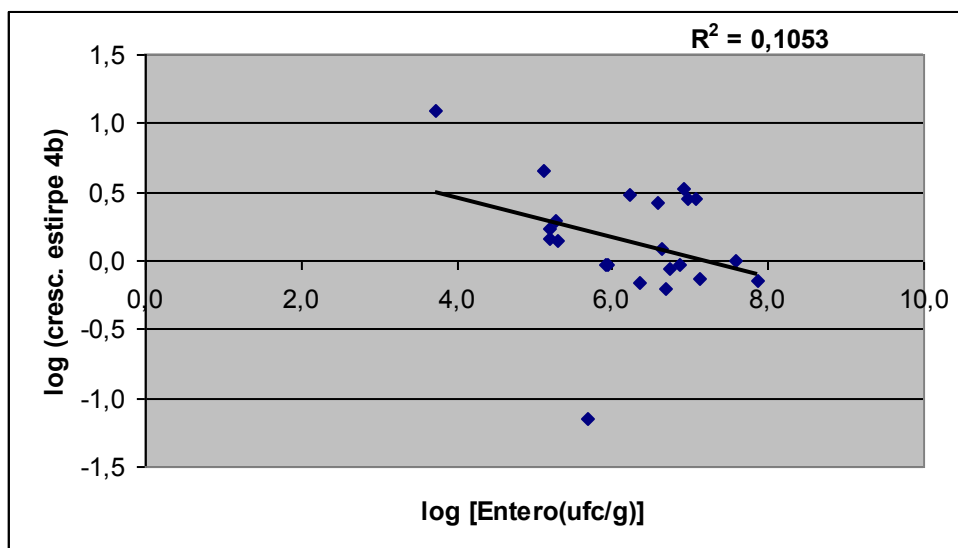
**Figura 21** – Relação entre a presença de psicrotróficos e o crescimento de *L. monocytogenes* estirpe 1/2a



**Figura 22** - Relação entre a presença de psicrotróficos e o crescimento de *L. monocytogenes* estirpe 4b



**Figura 23** - Relação entre a presença de *Enterobacteriaceae* e o crescimento de *L. monocytogenes* estirpe 1/2a



**Figura 24** - Relação entre a presença de *Enterobacteriaceae* e o crescimento de *L. monocytogenes* estirpe 4b

### 4.3 - Resultados da Análise Sensorial

De modo a analisar os resultados obtidos nas provas de análise sensorial, foi utilizado o teste estatístico *Least Significance Differences* (LSD). É um método de comparação múltipla a utilizar para pequenas amostras, sendo por isso um dos mais utilizados (Milliken e Johnson, 1997). A partir deste teste podem calcular-se as médias das

diferenças sensoriais entre cada par de saladas, bem como analisar a variância encontrada entre os quatro pares de saladas.

## 5 - Discussão de resultados

### 5.1 - Discussão de resultados da Análise Microbiológica

#### 5.1.1 – Discussão de resultados das contagens de psicrotróficos aeróbios totais e *Enterobacteriaceae*

A contagem média de psicrotróficos aeróbios e de *Enterobacteriaceae* é respectivamente de  $2,2 \times 10^7$  ufc/g e  $4,3 \times 10^6$  ufc/g. Estes valores mostram um nível médio de contaminação higiênica elevada.

Através da análise do Quadro 7 e da Figura 15, pode verificar-se que a contagem destes dois grupos de microrganismos é diferente para cada uma das marcas e variedades analisadas. O valor mais elevado da contaminação de psicrotróficos aeróbios corresponde à salada Mescla da marca Q ( $7,2 \times 10^7$  ufc/g) enquanto que o valor mais baixo corresponde à variedade Gourmet da Marca A ( $5,9 \times 10^6$  ufc/g). O nível de contaminação de *Enterobacteriaceae* é também mínimo e máximo para as mesmas variedades. Para a Salada Mescla da marca Q ( $1,1 \times 10^7$  ufc/g) e para a salada Gourmet da Marca A ( $4,6 \times 10^5$  ufc/g). Podem ser um indicativo de que a composição em ingredientes das saladas é determinante do seu nível de contaminação microbiológica. Dentro da mesma marca as diferentes variedades apresentam níveis de contaminação muito diferentes, o que poderá indicar que não só as técnicas higio-sanitárias empregues são de extrema importância no nível de contaminação como também os ingredientes que constituem as diferentes variedades de saladas e as suas proveniências. Por outro lado, se considerarmos a mesma variedade de salada, para diferentes marcas verifica-se que a salada Gourmet (variedade de salada avaliada para todas as marcas estudadas) apresenta um nível de contaminação higiênica bastante mais elevado para a marca Q. Embora o número de saladas Gourmet avaliadas da marca Q seja consideravelmente menor que o número de saladas analisadas das restantes marcas, levando a um resultado menos preciso, provavelmente o processamento da salada da referida marca possui um controle higiênico menos rigoroso que o utilizado no processamento das restantes. Uma vez que a salada que tem maior número de ingredientes tem também um nível de contaminação mais elevado, permite-nos concluir que a lavagem não é feita de forma

diferenciada, tendo em conta o nível de contaminação inicial de cada ingrediente, mas de uma forma igual para todos.

Através da análise dos diagramas apresentados na Figura 16 podemos verificar que a salada com maior contaminação de psicotróficos possui uma contaminação da ordem de 8 ciclos logarítmicos, que corresponde a uma contaminação superior a  $3,0 \times 10^8$  ufc/g. Por outro lado, a salada analisada que contém um nível de contaminação mínimo destes microrganismos, apresenta um valor de 4 ciclos logarítmicos, correspondente a uma contaminação de  $4,6 \times 10^4$  ufc/g.

Relativamente ao diagrama obtido a partir do nível de contaminação das *Enterobacteriaceae* podemos verificar que o valor mais alto da contaminação corresponde a 7 ciclos logarítmicos, isto é, uma contagem de microrganismos superior a  $1,5 \times 10^7$  ufc/g, tendo sido esta contagem verificada em duas das amostras analisadas. No outro extremo apresenta-se uma contaminação de valor superior a 3 ciclos logarítmicos, ou seja,  $5,5 \times 10^3$  ufc/g. A visualização destes diagramas permite também inferir que a distribuição dos logaritmos das contagens de psicotróficos é assimétrica, na medida em que se verifica uma maior concentração de contagens na região acima da mediana. No diagrama correspondente ao log de *Enterobacteriaceae* também se verifica uma assimetria, embora menos pronunciada, ocorrendo também uma concentração superior das contagens relativamente mais altas, pois as contagens que se encontram entre o 1º Quartil e a mediana, bem como entre a mediana e o 3º Quartil são bastante semelhantes.

Através da análise da Figura 17 verifica-se que o declive associado à linha de tendência, indica uma correlação, entre estes dois grupos de microrganismos, positiva. Verifica-se que 58,5 % da variabilidade da contagem de psicotróficos é explicada pela contagem de *Enterobacteriaceae*. Isto é, existe alguma correlação entre a presença destes dois tipos de microrganismos, embora não seja muito forte. Quando a contagem de *Enterobacteriaceae* na amostra é elevada, a contagem de psicotróficos é geralmente também elevada, do mesmo modo, quando a contagem de *Enterobacteriaceae* é baixa a contagem de psicotróficos será na maioria dos casos também baixa.

### **5.1.2 – Discussão de resultados das contagens de *Escherichia coli***

Os resultados obtidos mostram que apenas 3 % das amostras analisadas tinham presença de *E. coli* e que só em 1,5 % dos casos estes apresentavam factores de patogenicidade. Desta forma, visto que este microrganismo coliforme é um indicador de contaminação fecal, estamos perante um nível bastante baixo desta contaminação.

### **5.1.3 – Discussão de resultados das contagens de *Listeria spp.***

Apenas 1,5 % das amostras analisadas apresentaram contaminação por *Listeria spp.* A espécie encontrada foi *L. innocua*, que não é patogénica. O nível de contaminação por microrganismos deste género pode então ser considerado bastante satisfatório.

### **5.1.4 – Discussão de resultados das contagens de *Aeromonas hydrophila***

Verificou-se a presença de *A. hydrophila* em apenas 9 % das saladas analisadas. No entanto, devido ao facto de no meio por nós utilizado crescerem muitos outros microrganismos que não *A. hydrophila*, é bastante provável que não tenha sido identificada mesmo estando presente nas saladas. A presença de microrganismos morfológicamente muito semelhantes torna difícil a identificação, ainda que tenha sido sempre feita a comparação com a estirpe de controlo. De qualquer forma, a percentagem de saladas contaminadas é relativamente elevada e as contagens destas são demasiado elevadas nestes alimentos.

### **5.1.5 – Discussão de resultados das contagens de *Bacillus cereus***

Através da análise dos resultados expressos na Figura 18, podemos ver que quase todos os casos em que se verificou a presença deste microrganismo correspondem a amostras de saladas da marca Q. Tendo em conta que, em todas as variedades pertencentes a esta marca foi encontrada contaminação por *B. cereus*, a contaminação deverá ser anterior ao processamento e resultante da ineficácia do mesmo.

Da totalidade de *B. cereus* encontrados nas amostras analisadas, verificou-se que 41,2 % são produtores de toxina diarreica. Apesar de muitas estirpes serem produtoras de toxina, o nível de contaminação é baixo, não se tornando perigoso para a saúde dos consumidores.

#### **5.1.6 – Discussão dos resultados da pesquisa de *Salmonella* spp., de *Listeria monocytogenes* e de *Escherichia coli* O157 H7**

A pesquisa de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *E. coli* O 157 H7 pelo método VIDAS demonstrou a presença de *L. monocytogenes* em 1,5% das saladas analisadas, não tendo sido confirmada a presença de *Salmonella* spp. e de *E. coli* O157 H7 em nenhuma destas amostras. Como referido no capítulo anterior, obtiveram-se 3 resultados positivos em cada uma destas pesquisas, no entanto, a presença destes microrganismos não foi confirmada. Esta situação pode ter sido devida à elevada contaminação por outros microrganismos aquando da etapa de isolamento, que não permitiram o seu desenvolvimento ou ao facto de este método ter apresentado resultados falsos positivos.

#### **5.2 – Discussão de resultados da contaminação de saladas com *Listeria monocytogenes***

A análise dos resultados obtidos através da contaminação de saladas com *L. monocytogenes* é para ambas as estirpes variável. Em algumas amostras verificou-se o crescimento do microrganismo durante o tempo de armazenagem, enquanto que noutras o oposto, ou seja, um decréscimo. No entanto, em qualquer dos casos a diferença verificada é pouco expressiva, estando os valores do log do crescimento próximos do zero.

O valor médio para o log do crescimento é diferente para as 2 estirpes, apresentando um valor de 0,14 para a estirpe 4b e um valor de -0,02 para a estirpe 1/2a. Estes resultados poderão indicar que a estirpe 4b cresce embora com uma taxa lenta nestes alimentos, durante o seu normal armazenamento, enquanto que a estirpe 1/2a, pelo contrário, não se desenvolve, podendo diminuir sob as mesmas condições.

A análise da relação entre os dias de armazenamento a que foram sujeitas as amostras e o crescimento apresentado pelas duas estirpes (Anexo 33), permite verificar que em todas as amostras armazenadas durante 5 dias, ocorreu crescimento. Estes resultados poderão indicar que o armazenamento, por um período igual ou superior a 5 dias, permite o crescimento de *L. monocytogenes*, aquando da sua presença nestes alimentos. No entanto, apenas duas amostras foram armazenadas durante este número de dias e este foi o tempo máximo de armazenamento experimentado neste estudo, portanto, seria necessária uma maior amostragem para poder tirar conclusões mais precisas.

O crescimento das duas estirpes de *L. monocytogenes* na mesma amostra de salada parece não estar muito relacionado. A Figura 20 apresenta-nos um  $R^2$  de 0,2273, este valor prova que apenas 22,7 % do crescimento apresentado por uma estirpe é indicador do crescimento da outra estirpe na mesma salada. Assim, o maior ou menor crescimento de uma das estirpes numa das amostras de salada, não indica que nessa mesma amostra o crescimento da outra estirpe seja semelhante. No entanto, em 22,7 % dos casos um maior crescimento de uma das estirpes indica também um maior crescimento da outra estirpe na mesma amostra. A pequena correlação apresentada é positiva, facto que é indicado pelo declive positivo da linha de tendência associada aos resultados.

Através da realização dos gráficos apresentados nas Figuras 21 a 24, pretendeu-se avaliar de que modo a carga microbiana presente nas amostras, isto é, a carga de psicotróficos e *Enterobacteriaceae*, teria influência no crescimento de *L. monocytogenes*. Assim, correlacionando-se as quatro variáveis entre si (contagem de psicotróficos, contagem de *Enterobacteriaceae*, crescimento de *L. monocytogenes* estirpe 1/2a, crescimento de *L. monocytogenes* estirpe 4b), obtiveram-se os seguintes valores de  $R^2$ : 0,0322 (Psicotróficos – *L. monocytogenes* 1/2a), 0,1135 (Psicotróficos – *L. monocytogenes* 4b), 0,0094 (*Enterobacteriaceae* - *L. monocytogenes* 1/2a) e 0,1053 (*Enterobacteriaceae* - *L. monocytogenes* 4b). Todos estes valores são muito próximos de 0, o que indica uma correlação quase nula entre a carga microbiana presente nas saladas e o consequente crescimento de *L. monocytogenes* nas mesmas. No entanto, é importante salientar que embora em pequena escala, o crescimento da estirpe 4b parece ser mais influenciado pela carga microbiana presente na mesma do que o da estirpe 1/2a, pois os valores de  $R^2$  são ligeiramente mais altos. Em qualquer uma

destas correlações estudadas pode verificar-se que a correlação, embora quase nula, é sempre negativa, ou seja, uma carga microbiana mais alta indica um menor crescimento das estirpes de *L. monocytogenes* inoculadas nas saladas.

### **5.3 - Discussão de resultados da Análise Sensorial**

Através do tratamento estatístico dos resultados da análise sensorial, podemos verificar que todos os pares de saladas testados foram considerados diferentes, tendo em conta a média das classificações dos diferentes provadores. O par de saladas da variedade César da marca F, foi aquele considerando pelos provadores com menores diferenças sensoriais entre si. Apresentou um valor de médio de 2,375, considerando uma escala de 0 a 10, em que 0 se refere a saladas sem diferenças e 10 se refere a saladas extremamente diferentes, ou seja, sem qualquer semelhança entre si (como já referido em 3.6). Por outro lado, as saladas das variedades Gourmet (marca F) e Mescla (marca Q) são aquelas que possuem um nível de diferença superior (da ordem dos 4,5).

Através da análise ANOVA a um factor (Quadro 10), pode verificar-se que apesar de os valores médios dos níveis de diferença não serem iguais entre os quatro grupos avaliados, estas diferenças não podem ser consideradas significativas, na medida em que os valores de  $p$  obtidos pelo teste LSD foram para todas as combinações de pares superiores a 0,05 ( $p > 0.05$ ). Deste modo, verifica-se que ocorrem alterações de sabor neste tipo de saladas durante o tempo que decorre entre a sua colocação no mercado e o final do seu prazo de validade. O facto de não ocorrerem diferenças significativas entre marcas e variedades permite aferir que ocorrem sempre alterações sensoriais neste tipo de produtos, ao longo do período ensaiado e não é um factor que dependa da marca ou da variedade da salada em questão.

## 6 - Conclusões

Embora não exista, em Portugal, legislação relativamente à carga microbiana máxima de psicotróficos e *Enterobacteriaceae*, que indicam um nível higiénico satisfatório destes alimentos, os valores médios obtidos neste estudo, indicam uma contaminação higiénica relativamente elevada.

As saladas da marca Q apresentam um número superior de contaminação por microrganismos patogénicos do que as saladas das marcas F e A. Este facto pode indicar que o processamento aplicado e realizado por esta marca Q apresenta alguma deficiência que deveria ser reformulada para obtenção de produtos de qualidade superior à apresentada.

A percentagem de saladas naturalmente contaminadas com *L. monocytogenes* determinada é de 1,5 %. Este valor encontra-se situado entre a gama de percentagens apresentadas por outros trabalhos, para a contaminação por este microrganismo em saladas e vegetais crus, referidos no início deste trabalho.

É possível concluir, que o crescimento de *L. monocytogenes* não foi suportado por este tipo de saladas. Isto é, não se verifica o crescimento de *L. monocytogenes* nas saladas MP, por nós estudadas, sob as condições normais de armazenamento em casa do consumidor. A inibição do crescimento encontrada, nas amostras por nós contaminadas, parece não estar relacionada com a maior ou menor presença da restante microflora das saladas MP (psicotróficos e *Enterobacteriaceae*).

## 7 - Referências bibliográficas

- ALZAMORA, S.M.; LÓPEZ-MALO, A.; TAPIA, M.S. (2000). Minimally processed fruits and vegetables. Aspen, 1-9, Gaithersburg.
- AURELI, P.; FIORUCCI, G.C.; CAROL, D.; MARCHIARO, B.; NOVARA, O., LEONE, L.; SALMOSO, S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New England Journal of Medicine*, **342**, 1236–1241.
- BECHAUT, L.R. (1996). *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food control*, **7**, 223-228.
- BECHAUT, L.R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, **4**, 413-423.
- BENNIK, M.H.J.; PEPPELENBOS, H.W.; NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M. (1996). Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. *Postharvest Biology and Technology*, **9**, 209-221.
- DOYLE, M.P.; BECHAUT, L. R.; MONTVILLE, T.J. (2001). Food microbiology fundamentals and frontiers. ASM Press, 127-138, 383-409, Washington, USA.
- FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; JOHNSTON, M.A. (1989). A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *Journal of Food Protection*, **52**, 456-458.
- FARBER, J.M. e PETERKIN, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*: A food-borne pathogen. *Microbiology Reviews*, **55**, 476–511.
- FILIPE, L.M. (2005). Aspectos da microbiologia de vegetais para consumo em fresco. Dissertação para obtenção de grau de mestre em Ciência e Engenharia de Alimentos. UTL, ISA, Lisboa, 42-94.

- FRÖDER, H. (2005). Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas. Dissertação para obtenção do grau de mestre. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo. 14 – 31.
- GAMEIRO, N. (2004). Efeito do tempo de maturação do queijo de ovelha no comportamento de *Listeria monocytogenes*. Relatório de fim de curso de Engenharia Agronómica. UTL, ISA, Lisboa. 4-19.
- GEORGES, M. e LUND. B. M. (1992). The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *Letters in Applied Microbiology*, **15**, 49-52.
- GRANADOS, J.A. (2000). Enciclopédia del aceite de oliva. Editorial Planeta S.A., Barcelona.
- GUERRA, M.M.; McLAUHLIN, J.; BERNARDO, F.A. (2001). *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology*, **18**, 423-429.
- HOF, H. e ROCOURT, J. (1992). Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in food a health risk?. *International Journal of Food Microbiology*, **16**, 173–182.
- JOHANNESSEN, G.S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. (2002). Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, **77**, 194-204.
- LIN, C.M.; FERNANDO, S.; WEI, C.I. (1996). Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in vegetables salads. *Food Control*, **7**, 135-140.

- LECLERCQ, A. (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, RAPID'L.mono and ALOA solid media. *Journal of Microbiological Methods*, **57**, 251-258.
- LOURO, L. e NUNES, J.C. (1988). Análise sensorial em alimentos. Ministério da Indústria e Energia, Lisboa, 1-15.
- McLAUHLIN, J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, **7**, 187-193.
- MEJLHOLM, O. e DALGAARD, P. (2007). Modeling and predicting the growth of lactic acid bacteria in lightly preserved seafood and their inhibiting effect on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **70**, 2485-2497.
- MILER, A.J.; SMITH, J.L.; SOMKUTI, G.A. (1990). Foodborne Listeriosis. Elsevier Science Pub., 61-65, Nova Iorque, USA.
- MELLEFONT, L. A.; McKeekin, T.A.; Ross, T. (2008). Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* in co-culture. *International Journal of Food Microbiology*, **121**, 157-168.
- MILLIKEN, G.A. e JOHNSON, D.E. (1997). Analysis of Massy Data: designed experiments. Volume I. Chapman & Hall, 32-33, London, UK.
- NEVES, E.; SILVA, A.C.; ROCHE, S.; VELGE, P.; BRITO, L. (2008). Virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from the cheese dairy environment other foods and clinical cases, *Journal of Medical Microbiology*, **57**, 411-415.
- NØRRUNG, B.; ANDERSEN, J.K.; SCHLUNOTT, J. (1999). Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, **53**, 195-203.
- NORMA ISO 11290-2:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Enumeration method. AMENDMENT 1. (2004). Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.

- NORMA ISO 6887-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of initial suspension and decimal dilutions.
- NORMA ISO 17410:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms.
- NORMA ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide.
- NORMA ISO 21528-2:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2: Colony-count method.
- NORMA ISO 7932:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony-count technique at 30°C.
- NORMA ISO 7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* – Colony-count technique.
- NORMA ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
- ODUMERU, J.A.; MITCHELL, S.J.; ALVES, D.M.; LYNCH, J.A.; YEE, A.J.; WANG, S.L.; STYLIADIS, S.; FARBER, J.M. (1997). Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. *Journal of Food Protection*, **60**, 954-960.
- PAMPULHA, M. E. e OLIVEIRA, A. (2004/2005). Microbiologia geral, trabalhos práticos. UTL, ISA, Lisboa.

- PINE, L.; KATHARIOU, S.; QUINN, F.; GEORGE, V.; WENGER, J.D.; WEAVER, R.E. (1991). Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco-2 cells differentiate virulent from a virulent *Listeria* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**, 990–996.
- PINGULKAR, K.; KAMAT, A.; BONGIRWAR, D. (2001). Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **52**, 15-23.
- PINTADO, C.M.B.; FERREIRA, M.A.S.S.; GRANT, K.A.; HALFORD-MAW, R.; HAMPTON, M.D.; McLAUHLIN, J. (2007). Investigation of routes of contamination and persistence of *Listeria monocytogenes* in ewe's-milk processing plants in Portugal. ISOPOL XVI – 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, 20-23 March, Savannah, Georgia, USA.
- Regulamento (CE) N° 2073 da Comissão de 15 Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, Portugal, L308/ 1-26.
- Regulamento (CE) N° 1441/2007 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, Portugal.
- Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. (FAO/OMS), Food quality and standard service, 33, Suíça, Genebra. 2004.
- The community summary report on trends and sources of zoonoses. European Food Safety Authority. December 2007, 133.
- RYSER, E. T. e MARTH, E. H. (1991). *Listeria*, listeriosis and food safety. Marcel Decker, inc, 1-16, 45-60, 513 – 528, New York, USA.
- SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; WARD, L.; MITCHELL, R.T. (2003a). Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. *Journal of Food Protection*, **66**, 403-409.

- SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; MITCHELL, R.T. (2003b). Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: effectiveness of food hygiene training of management. *Journal of Food Protection*, **66**, 1581-1586.
- SEELIGER, H.P.R. e JONES, D. (1986). Genus *Listeria* Pirie 1940, 383<sup>AL</sup>. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Williams & Wilkins, USA, 1235-1245.
- SILVA, L. M. (1994). *Estatística aplicada à Psicologia e Ciências Sociais*. Editora McGraw-Hill de Portugal Lda, 60, Lisboa.
- SIZMUR, K. e WALKER, C.W. (1988). *Listeria* in prepacked salads. *The Lancet*, **1**, 1167.
- SORIANO, J.M.; RICO, H.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. (2001). *Listeria* species in raw and ready-to-eat foods from restaurants. *Journal of Food Protection*, **64**, 551-553.
- VARKASAS, T.H. e LOANNIS, S.A. (2008). Application of ISO22000 and comparison to HACCP for processing of ready to eat vegetables: Part I. *International Journal of Food Science and Technology*, **43**, 1729-1741.
- WHO Surveillance Programme for control of Foodborne infections and Intoxications in Europe. 8th report 1999-2000. Country Reports: Portugal, WHO.
- WILEY, R.C. (1997). *Frutas y hortalizas mínimamente processadas y refrigeradas*. Ed Acribia, SA., 1-227, Zaragoza, Espanha.

## 8 – Cybergrafia citada e consultada

- [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612004000200008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612004000200008&script=sci_arttext) (20-02-08)
- <http://www.ital.sp.gov.br/bjartigosbjft2006p06248.pdf> (20-02-08)
- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1352237> (25-04-08)
- <http://aem.asm.org/cgi/reprint/72/1/776.pdf> (25-04-08)
- <https://sioi.fcm.unl.pt/publico/fileDownload.do;jsessionid=5A0940017511377E0563E7EE425E41B3?itemCode=926&fileName=Meios%20Cultura.pdf> (06-09-08)
- [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612008000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612008000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=es) (07-09-08)
- <http://www.rapidmicrobiology.com/news/995h27.php> (12-10-08)
- <http://www.biomerieux.pt> (15-10-08)
- <http://www.oxid.com> (15-10-08)
- [http://users.med.up.pt/cc04-10/Microdesgravadas/8\\_Enterobacteriaceas.pdf](http://users.med.up.pt/cc04-10/Microdesgravadas/8_Enterobacteriaceas.pdf) (15-10-08)
- <http://www.bio-rad.com> (16-10-08)
- <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Dynal.html> (19-10-08)
- [http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/6840/92435\\_TBX\\_Agar.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/6840/92435_TBX_Agar.pdf) (19-10-08)
- <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/m10a.html> (20-10-08)
- <http://www.microedservices.com/ASCatViewer/ProdInserts/BHI%20Agar%20Insert.pdf> (20-10-08)
- <http://www2.mat.ua.pt/pessoais/AHall/Bioestat%C3%ADstica/SlidesBioestat%C3%ADstica2.ppt> (24-10-08)
- <http://www.exatec.unisinos.br/~gonzalez/valor/inferenc/testes/determ.html> (01-11-08)
- <http://www.bd.com> (24-10-08)
- <http://www.rapidmicrobiology.com/Companies/1064.php> (24-10-08)

## **Anexos**

### **Anexo 1 - Composição e modo de preparação do meio PCA ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))**

#### **Composição**

- Peptona de caseína (bovino) 5,0 g
- Extracto de levedura 2,5 g
- Glucose 1,0 g
- Agar 15,0 g
- Água destilada 1 L

**(pH 7,0)**

#### **Procedimento**

1. Desenroscar previamente a cápsula do frasco de gelose.
2. Colocar a gelose em banho-maria a, aproximadamente, 50°C, aumentar a temperatura até 95 °C e deixar derreter a gelose (durante cerca de 45 min).
3. Homogeneizar após enroscar a tampa (utilizar luvas de protecção contra os riscos térmicos).
4. Deixar os frascos à temperatura ambiente pelo menos 15 segundos antes de os transferir para um banho de água com o termóstato aproximadamente a 45-50 °C. Manter os frascos a esta temperatura até utilização.

### **Anexo 2 - Composição e modo de preparação do meio VRBG ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))**

#### **Composição**

- Hidrolisado pancreático de gelatina (bovina ou suína) 7,000 g
- Extracto de levedura 3,000 g
- Glucose 10,000 g
- Cloreto de sódio 5,000 g
- Vermelho neutro 0,030 g
- Cristal violeta 0,002 g
- Sais biliares (bovinos ou ovinos) 1,500 g
- Agar 12,000 g

- Água destilada

1 L

(pH 7,4)

### **Procedimento**

1. Desenroscar previamente a cápsula do frasco de gelose.
2. Colocar o frasco a regenerar em banho-maria, a aproximadamente, 50 °C, deixar a temperatura aumentar até 95 °C e derreter a gelose (durante, aproximadamente, 45 min).
3. Homogeneizar após o fecho da cápsula (utilizar luvas de protecção contra os riscos térmicos).
4. Deixar os frascos à temperatura ambiente durante, pelo menos, 15 segundos antes de os transferir para um banho-maria com o termóstato aproximadamente a  $47 \pm 2$  °C. Manter os frascos a esta temperatura até utilização, sem exceder 6 h.

**Anexo 3** - Composição e modo de preparação do meio TBX  
([http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/6840/92435\\_TBX\\_Agar.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/6840/92435_TBX_Agar.pdf))

### **Composição**

- |                     |          |
|---------------------|----------|
| • Peptona           | 20,000 g |
| • Sais biliare      | 1,500 g  |
| • X-β-D glucuronide | 0,075 g  |
| • Agar              | 15,000 g |
| • Água destilada    | 1 L      |

(pH 7,2)

### **Procedimento** (www.biomerieux.pt)

1. Desenroscar previamente a cápsula do frasco de gelose.
2. Colocar o frasco a regenerar em banho-maria, a aproximadamente, 50 °C, deixar a temperatura aumentar até 95 °C e derreter a gelose (durante, aproximadamente, 45 min).
3. Homogeneizar após o fecho da cápsula (utilizar luvas de protecção contra os riscos térmicos).
4. Deixar os frascos à temperatura ambiente durante, pelo menos, 15 segundos antes de os transferir para um banho-maria com o termóstato

aproximadamente a  $47 \pm 2$  °C. Manter os frascos a esta temperatura até utilização, sem exceder 6 h.

**Anexo 4** - Composição e modo de preparação do meio ALOA  
(<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/m10a.html>)

### **Composição**

• Peptona de carne	18,00 g
• Triptona	6,00 g
• Extracto de levedura	10,00 g
• Piruvato de sódio	2,00 g
• Glucose	2,00 g
• Glicerofosfato de magnésio	1,00 g
• Sulfato de magnésio	0,50 g
• Cloreto de sódio	5,00 g
• Cloreto de lítio	10,00 g
• Hidrogenofosfato dissódico	2,50 g
• 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucopiranosida	0,05 g
• Agar (dependendo da força de gelificação)	12 gr – 18 g
• Água destilada (dependendo do volume de suplemento)	925 L – 930 L

(pH  $7,2 \pm 0,2$ )

### **Procedimento**

1. Dissolver a base desidratada em água a ferver.
2. Esterilizar no autoclave a 121 °C durante 15 min.
3. Preparar o suplemento (L- $\alpha$ -fosfatidil-inositol) dissolvendo 2 g deste em 50 mL de água destilada fria e agitar durante cerca de 30 min até obter uma suspensão homogénea.
4. Dissolver os seguintes componentes individualmente nos solventes específicos e filtrar as soluções para esterilizar: 0,02 g de Ácido nalídixico em 5 mL de água; 0,02 g de Ceftazidima em 5 mL de água; 76700 U de Polimixina B em 5 mL de água; 0,05 g de Cicloheximida em 2,5 mL de etanol e adicionar 2,5 mL de água; 0,01 g de Anfotericina B numa mistura de 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) (1 M) e 7,5 mL de Dimetilformamida.

5. Misturar os seguintes constituintes para completar o meio: 925 - 930 mL de agar base; 5 mL da solução de ácido nalídixico; 5 mL da solução de Ceftazidima; 5 mL da solução de Cicloheximida (ou 10 mL da solução de Anfotericina B); 5 mL da solução de Polimixina B e 50 mL da solução de L- $\alpha$ -fosfatidil-inositol.

**Anexo 5** - Composição e modo de preparação do meio TSA ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))

**Composição**

- Peptona de caseína (bovina) 15 g
- Peptona de soja 5 g
- Cloreto de sódio 5 g
- Agar 15 g
- Água destilada 1 L

(pH 7,3)

**Procedimento**

1. Deixar as placas atingir a temperatura ambiente.

**Anexo 6** - Composição e modo de preparação do meio Ryan ([www.oxid.com](http://www.oxid.com))

**Composição**

- Peptona 5,00 g
- Extracto de levedura 3,00 g
- Monocloridrato de L-Lisina 3,50 g
- Monocloridrato de L-Arginina 2,00 g
- Sorbitol 3,00 g
- Inositol 2,50 g
- Lactose 1,50 g
- Xylose 3,75 g
- Sais biliares N° 3 3,00 g
- Tiosulfato de sódio 10,67 g
- Cloreto de sódio 5,00 g

- Citrato férrico de amónio 0,80 g
- Azul de bromotimol 0,04 g
- Azul de timol 0,04 g
- Agar 12,50 g
- Água destilada 1 L

**(pH 8 ± 0,1)**

**Procedimento**

Suspender 29,5 g de meio Ryan em 500 mL de água destilada. Colocar em fervura. (Não autoclavar). Arrefecer a 50 °C e adicionar assépticamente um frasco de Ampicilina rehidratada (suplemento selectivo). Agitar e colocar em placas de Petri.

**Anexo 7 - Composição e modo de preparação do meio TSC ([www.oxid.com](http://www.oxid.com))**

**Composição**

- Triptose 15 g
- Peptona de soja 5 g
- Extracto de carne (Lab-Lemco) 5 g
- Extracto de levedura 5 g
- Metasulfito de sódio 1 g
- Citrato férrico de amónio 1 g
- Agar 1 g
- Água destilada 1 L
- D-cycloserina (Suplemento) 200 mg

**(pH 7,6 ± 0,2)**

**Procedimento**

Adicionar a cada 500 mL de Agar base arrefecido a 50 °C os componentes rehidratados do suplemento TSC (200 mg de D-cycloserina) e 25 mL de emulsão de gema de ovo. Agitar conveniente e colocar em placas de Petri

## **Anexo 8 - Composição e modo de preparação do meio Mossel ([www.oxid.com](http://www.oxid.com))**

### **Composição**

• Peptona	1,00 g
• Manitol	10,00 g
• Cloreto de sódio	2,00 g
• Sulfato de magnésio	0,10 g
• Hidrogénio fosfato dissódico	2,50 g
• Dihidrogénio fosfato de potássio	0,25 g
• Azul de bromotimol	0,12 g
• Piruvato de sódio	10,00 g
• Agar	14,00 g
• Água destilada	1 L
• Polimixina B (Suplemento)	50000 IU

**(pH 7,2 ± 0,2)**

### **Procedimento**

Suspender 20,5 g de meio em 475 mL de água destilada e levar a ferver para se dissolver completamente. Esterilizar no autoclave a 121 °C durante 15 min. Arrefecer a 50 °C e misturar os componentes de um frasco com o suplemento reconstituído com 2 mL de água destilada estéril. Seguidamente adicionar 25 mL de emulsão estéril de gema de ovo. Agitar convenientemente e colocar em placas de petri.

## **Anexo 9 - Composição e modo de preparação do meio COS ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))**

### **Composição**

• Peptona de caseína e de carne (bovino e porcino)	10,0 g
• Hidrolisado de proteínas animais (bovino ou porcino)	10,0 g
• Peptona de coração (bovino ou porcino)	3,0 g
• Amido de milho	1,0 g
• Cloreto de sódio	5,0 g
• Agar	13,5 g
• Sangue (carneiro)	50 mL

- Água destilada 1 L

(pH 7,3)

### **Procedimento**

1. Deixar as placas atingir a temperatura ambiente.

### **Anexo 10 - Composição do meio BPW ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))**

#### **Composição**

- Peptona de caseína e de gelatina (bovina e porcina) 10,0 g
- Cloreto de sódio 5,0 g
- Di-sódio hidrogenofosfato (12 H<sub>2</sub>O) 9,0 g
- Potássio dihidrogenofosfato 1,5 g
- Água destilada 1 L

(pH 7,0)

### **Anexo 11 – Composição do caldo TS ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))**

#### **Composição**

- Peptona de caseína (bovina) 1,0 g
- Cloreto de sódio 8,5 g
- Água destilada 1 L

(pH 7,0)

### **Anexo 12 – Composição e modo de preparação do caldo RVS-T ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))**

#### **Composição**

- Peptona de soja 4,500 g
- Cloreto de sódio 7,200 g
- Tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1,440 g

- Cloreto de magnésio 6 H<sub>2</sub>O 28,600 g
- Oxalato de verde malaquite 0,036 g
- Água destilada 1 L

(pH 5,2)

### **Procedimento**

1. Deixar os tubos atingir a temperatura ambiente.

**Anexo 13** - Composição e modo de preparação do caldo MKTTn-T  
(www.biomerieux.pt)

### **Composição**

- Peptona de extracto de carne (bovina ou porcina) 4,2300 g
- Peptona de caseína 8,4500 g
- Cloreto de sódio 2,5400 g
- Carbonato de cálcio 38,0400 g
- Tiosulfato de sódio anidro 30,2700 g
- Sais biliares (ovino ou bovino) 4,7500 g
- Iodo 4,0000 g
- Iodeto de potássio 5,0000 g
- Verde brilhante 0,0095 g
- Novobiocina 0,0390 g
- Água destilada 1 L

(pH 8,0)

### **Procedimento**

1. Deixar os tubos atingir a temperatura ambiente.

**Anexo 14** - Composição do caldo M (www.biomerieux.pt)

### **Composição**

- Peptona de caseína (bovina) 10,00 g
- Extracto de levedura 5,00 g

- Cloreto de sódio 5,00 g
- Fosfato bipotássico 5,00 g
- Citrato de sódio 5,00 g
- D-manose 2,00 g
- Sulfato de magnésio, 7H<sub>2</sub>O 0,80 g
- Sulfato ferroso, 7H<sub>2</sub>O 0,04 g
- Cloreto de manganésio, 4 H<sub>2</sub>O 0,14 g
- Tween 80 0,75 g
- Água destilada 1 L

**(pH 7,0)**

**Anexo 15** - Composição e modo de preparação do meio XLD ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))

#### **Composição**

- Xilose 3,50 g
- L.Lisina 5,00 g
- Lactose (bovina) 7,50 g
- Sacarose 7,50 g
- Cloreto de sódio 5,00 g
- Extracto de levedura 3,00 g
- Desoxicolato de sódio (ovino ou bovino) 2,50 g
- Tiosulfato de sódio 6,80 g
- Citrato de ferro amoniacal 0,80 g
- Vermelho de fenol 0,08 g
- Agar 13,50 g
- Água destilada 1 L

**(pH 7,4)**

#### **Procedimento**

1. Deixar as placas atingir a temperatura ambiente.

**Anexo 16** - Composição e modo de preparação do meio SM2 ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))

**Composição**

• Peptonas (porcino ou bovino)	6,25 g
• Tris	0,16 g
• Lactose (bovino)	6,00 g
• Sais biliares (bovino ou ovino)	1,50 g
• Mistura cromogénica	9,63 g
• Cloreto de sódio	5,00 g
• Mistura selectiva	0,03 g
• Agar	14,00 g
• Água destilada	1 L

(pH 7,3)

**Procedimento**

1. Deixar as placas atingir a temperatura ambiente.

**Anexo 17** - Composição e modo de preparação do meio TSI ([www.oxid.com](http://www.oxid.com))

**Composição**

• Extracto de carne (Lab-Lemco)	3,0 g
• Extracto de levedura	3,0 g
• Peptona	20,0 g
• Cloreto de sódio	5,0 g
• Lactose	10,0 g
• Sacarose	10,0 g
• Glucose	1,0 g
• Citrato de ferro	0,3 g
• Tiosulfato de sódio	0,3 g
• Vermelho de fenol	q.b.
• Agar	12,0 g
• Água destilada	1 L

(pH 7,4 ± 0,2)

### **Procedimento**

Suspender 65 g de meio em 1 L de água destilada. Levar a fervura para dissolver completamente. Mexer convenientemente. Esterilizar no autoclave a 121 °C durante 15 min. Colocar o meio em tubos, ajustando-o de forma a ficar inclinado.

### **Anexo 18 – Composição e modo de preparação do caldo Cf-d (www.biomerieux.pt)**

#### **Composição**

• Peptona de carne (bovina ou porcina)	5,0000 g
• Peptona de caseína (bovina)	5,0000 g
• Extracto de carne (bovino ou porcino)	5,0000 g
• Extracto de levedura	5,0000 g
• NaCl	20,0000 g
• Mistura de tampões	13,3500 g
• Esculina	1,0000 g
• Cloreto de lítio	3,0000 g
• Citrato de ferro amoniacal	0,5000 g
• Acriflavina	0,0125 g
• Ácido nalidíxico	0,0100 g
• Água destilada	1 L

(pH 7,3)

#### **Procedimento**

Deixar os tubos atingir a temperatura ambiente.

### **Anexo 19 - Composição do meio Fraser (www.biomerieux.pt)**

#### **Composição**

• Peptonas animais (bovinas ou porcinas)	10,000 g
• Extracto de carne (bovino ou porcino)	5,000 g
• Extracto de levedura	5,000 g
• NaCl	20,000 g
• Substâncias tampões	13,350 g

- Esculina 1,000 g
- Cloreto de lítio 3,000 g
- Citrato de ferro amoniacal 0,500 g
- Acriflavina 0,025 g
- Ácido nalidíxico 0,020 g
- Água destilada 1 L
- 

**(pH 7,3)**

**Anexo 20 - Composição do meio mTSB ([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))**

**Composição**

- Peptona caseínica 17,0 g
- Peptona de soja 3,0 g
- D(+) - Glucose 2,5 g
- NaCl 5,0 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g
- Água destilada 1 L

**(pH 7,3)**

**Anexo 21 - Composição e modo de preparação do meio MCK ([www.bd.com](http://www.bd.com))**

**Composição**

- Sais biliares 5,00 g
- Peptona 20,00 g
- Lactose 10,00 g
- Púrpura de bromocresol 0,01 g
- Água destilada 1 L

**(pH 7,3 ± 0,1)**

**Procedimento**

1. Dissolver 35 g de meio em pó em 1 L de água destilada

2. Colocar a solução acima preparada em tubos
3. Autoclavar a 121 °C durante 15 min

**Anexo 22** - Composição e modo de preparação do meio CT-SMAC  
([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))

### **Composição**

• Peptona de gelatina (bovina ou porcina)	17,000 g
• Peptona de carne (bovina ou porcina)	3,000 g
• Sorbitol	10,000 g
• Sais biliares N°3 (ovinos ou bovinos)	1,500 g
• Cloreto de sódio	5,000 g
• Vermelho neutro	0,030 g
• Cristal violeta	0,001 g
• Agar	15,000 g
• Água destilada	1 L
• Mistura CT (suplemento)	

(pH 7,1)

### **Procedimento**

1. Deixar os frascos atingir a temperatura ambiente.
2. Desenroskar previamente a cápsula do frasco da gelose.
3. Colocar o frasco a regenerar num banho-maria a, aproximadamente, 50 °C, deixar a temperatura atingir os 95 °C e deixar derreter a gelose (cerca de 45 min).
4. Homogeneizar após enroskar a cápsula (utilizar luvas de protecção contra os riscos térmicos).
5. Adicionar a 0,4 mL da mistura CT a cada frasco de meio, após rehidratação da mesma.
6. Deixar os frascos à temperatura ambiente durante, pelo menos, 15 segundos, antes de os transferir para um banho-maria com o termóstato a aproximadamente 45 °C – 50 °C. Manter os frascos a esta temperatura até os utilizar.
7. Distribuir em placas de Petri (na proporção de 18 a 20 mL por placa).

8. Após reconstituição e arrefecimento do meio, colocar as placas a 2 °C – 8°C

**Anexo 23** - Composição e modo de preparação do meio O157 H7 ID-F  
(www.biomerieux.pt)

### **Composição**

• Peptona de gelatina (bovina ou porcina)	5,50 g
• Extracto de levedura	6,00 g
• Cloreto de sódio	5,00 g
• Carbonato de sódio	0,13 g
• Vermelho neutro	0,01 g
• Sódio desoxicolato (bovino ou ovino)	1,50 g
• Mistura de hidratos de carbono (bovino)	24,00 g
• Mistura de activadores	0,25 g
• Mistura cromogénica	0,25 g
• Agar	12,50 g
• Água destilada	1 L
• Mistura CT (suplemento)	

(pH 7,1)

### **Procedimento**

1. Desenroscar previamente a cápsula do frasco de gelose.
2. Colocar o frasco a regenerar num banho-maria a, aproximadamente, 50 °C, deixar a temperatura subir até 95 °C e deixar derreter a gelose (cerca de 15 min). Não exceder 30 min após a regeneração.
3. Homogeneizar após o fecho da cápsula (utilizar luvas de protecção contra os riscos térmicos).
4. Deixar os frascos à temperatura ambiente durante, pelo menos, 15 segundos, antes de serem transferidos para um banho-maria a 45 °C – 50 °C. Manter os frascos a esta temperatura até à sua utilização. Durante a regeneração dos frascos em banho-maria a ferver, podem observar-se coágulos em espirais que desaparecem após agitação.
5. Adicionar a 0,4 mL da mistura CT a cada frasco de meio, após rehidratação da mesma.

6. Distribuir a integridade de um frasco numa placa de Petri e deixar arrefecer.

**Anexo 24** – Composição e modo de preparação do reagente da oxidase  
([www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt))

**Composição**

- N,N,N,N-tetrametil-1,4-fenilenediamina 10 g
- Ácido ascórbico 2 g
- Água desionizada 1 L

**Procedimento**

**Abertura da ampola:**

1. Colocar o frasco conta-gotas no quebra-ampolas.
2. Bater no fundo do frasco para eliminar as bolhas que se poderão formar.
3. Pegar no meio do conjunto frasco e quebra-ampolas e premir ligeiramente para partir a ampola

**Anexo 25** – Composição e modo de preparação do meio de glucose  
([www.rapidmicrobiology.com/Companies/1064.php](http://www.rapidmicrobiology.com/Companies/1064.php))

**Composição**

- Triptona 10,0 g
- Extracto de levedura 1,5 g
- Cloreto de sódio 5,0 g
- Glucose 10,0 g
- Púrpura de bromocresol 15,0 mg
- Agar bacteriológico 12,0 g
- Água destilada 1 L

**(pH 7,0 ± 0,2)**

## **Procedimento**

1. Antes da utilização do meio, é recomendado o aquecimento dos tubos em banho maria, durante o mínimo de tempo possível, para assegurar a total liquefacção do meio (não repetir este procedimento mais do que uma vez)

## **Anexo 26 - Quadro de leitura do API Listeria**

**QUADRO DE LEITURA**

TESTES	COMPONENTES ACTIVOS	QTD (mg/cúp.)	REACÇÕES	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
[DIM]	Substrato enzimático	0,106	Diferenciação <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	ZYM B / < 3 min	
				laranja pálido beige rosado beige acinzentado	laranja
ESC	Esculina Citrato de ferro	0,16 0,024	hidrólise (ESCulina)	amarelo pálido	negro
αMAN	4-nitrofenil-αD-manopiranosido	0,045	α-MANosidase	incolor	amarelo
DARL	D-Arabitól	0,4	acidificação (D-ARabitol)	vermelho / vermelho alaranjado	amarelo / amarelo alaranjado
XYL	D-Xylose	0,4	acidificação (XYLose)		
RHA	L-Rhamnose	0,4	acidificação (RHAMnose)		
MDG	Metil-αD-glucopiranosido	0,4	acidificação (Metil-αD-Glucopiranosido)		
RIB	D-Ribose	0,4	acidificação (RIBose)		
G1P	Glucose-1-Fosfato	0,4	acidificação (Glucose-1-Fosfato)		
TAG	D-Tagatose	0,4	acidificação (TAGatose)		

- As quantidades indicadas podem ser ajustadas em função dos títulos das matérias-primas.
- Algumas cúpulas contêm componentes de origem animal, nomeadamente peptonas.

## Anexo 27 – Quadro de leitura do API 20E

QUADRO DE LEITURA

TESTES	COMPONENTES ACTIVOS	QTD (mg/cúp.)	REACÇÕES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	2-nitrofenil-βD-galactopiranosida	0,223	β-galactosidase (Orto Nitrofenil-βD-Galactopiranosidase)	incolor	amarelo (1)
ADH	L-arginina	1,9	Arginina DiHidrolase	amarelo	vermelho / alaranjado (2)
LDC	L-lisina	1,9	Lisina DesCarboxilase	amarelo	vermelho / alaranjado (2)
ODC	L-ornitina	1,9	Ornitina DesCarboxilase	amarelo	vermelho / alaranjado (2)
[CIT]	Citrato de sódio	0,756	Utilização do CITrato	verde pálido / amarelo	azul-esverdeado / azul (3)
H <sub>2</sub> S	Tiosulfato de sódio	0,075	Produção de H <sub>2</sub> S	incolor / acinzentado	depósito negro / orla fina
URE	Ureia	0,76	UREase	amarelo	vermelho / alaranjado (2)
TDA	L-triptofano	0,38	Triptofano DesAminase	<u>TDA / imediato</u>	
				amarelo	castanho-avermelhado
IND	L-triptofano	0,19	Produção de INDol	<u>JAMES / imediato</u>	
				incolor verde pálido / amarelo	rosa
[VP]	Piruvato de sódio	1,9	Produção de acetoina (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				incolor / rosa pálido	rosa / vermelho (5)
[GEL]	Gelatina (origem bovina)	0,6	Gelatinase (GELatina)	não difusão	difusão do pigmento negro
GLU	D-glucose	1,9	fermentação / oxidação (GLUcose) (4)	azul / azul-esverdeado	amarelo / amarelo acinzentado
MAN	D-manitol	1,9	fermentação / oxidação (MANitol) (4)	azul / azul-esverdeado	amarelo
INO	Inositol	1,9	fermentação / oxidação (INOsitol) (4)	azul / azul-esverdeado	amarelo
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentação / oxidação (SORbitol) (4)	azul / azul-esverdeado	amarelo
RHA	L-ramnose	1,9	fermentação / oxidação (RAMnose) (4)	Azul / azul-esverdeado	amarelo
SAC	D-sacarose	1,9	fermentação / oxidação (SACarose) (4)	azul / azul-esverdeado	amarelo
MEL	D-melibiose	1,9	fermentação / oxidação (MELibiose) (4)	azul / azul esverdeado	amarelo
AMY	Amigdalina	0,57	Fermentação / oxidação (AMlgdalina) (4)	azul / azul-esverdeado	amarelo
ARA	L-arabinose	1,9	fermentação / oxidação (ARABinose) (4)	Azul / azul-esverdeado	amarelo
OX	(consultar o folheto informativo do teste oxidase)		Citocromo-Oxidase	(consultar o folheto informativo do teste oxidase)	

- (1) Uma cor amarela muito ligeira é também positiva.  
 (2) Uma cor laranja após 36-48 H de incubação deve ser considerada negativa.  
 (3) Leitura na cúpula (zona aeróbia).  
 (4) A fermentação começa na parte inferior dos tubos, a oxidação começa na cúpula.  
 (5) Uma ligeira coloração rosa depois de 10 minutos deve ser considerada negativa.

- As quantidades indicadas podem ser ajustadas em função dos títulos das matérias-primas.
- Algumas cúpulas contêm componentes de origem animal, nomeadamente, peptonas.

**Anexo 28 - Composição e modo de preparação do meio COH (www.biomerieux.pt)**

**Composição**

• Peptona de caseína e de carne (bovino e porcino)	10,0 g
• Hidrolisado de proteínas animais (bovino ou porcino)	10,0 g
• Peptona de coração (bovino ou porcino)	3,0 g
• Amido de milho	1,0 g
• Cloreto de sódio	5,0 g
• Agar	13,5 g
• Sangue (cavalo)	50 mL
• Água destilada	1 L

(pH 7,3)

**Procedimento**

1. Deixar as placas atingir a temperatura ambiente.

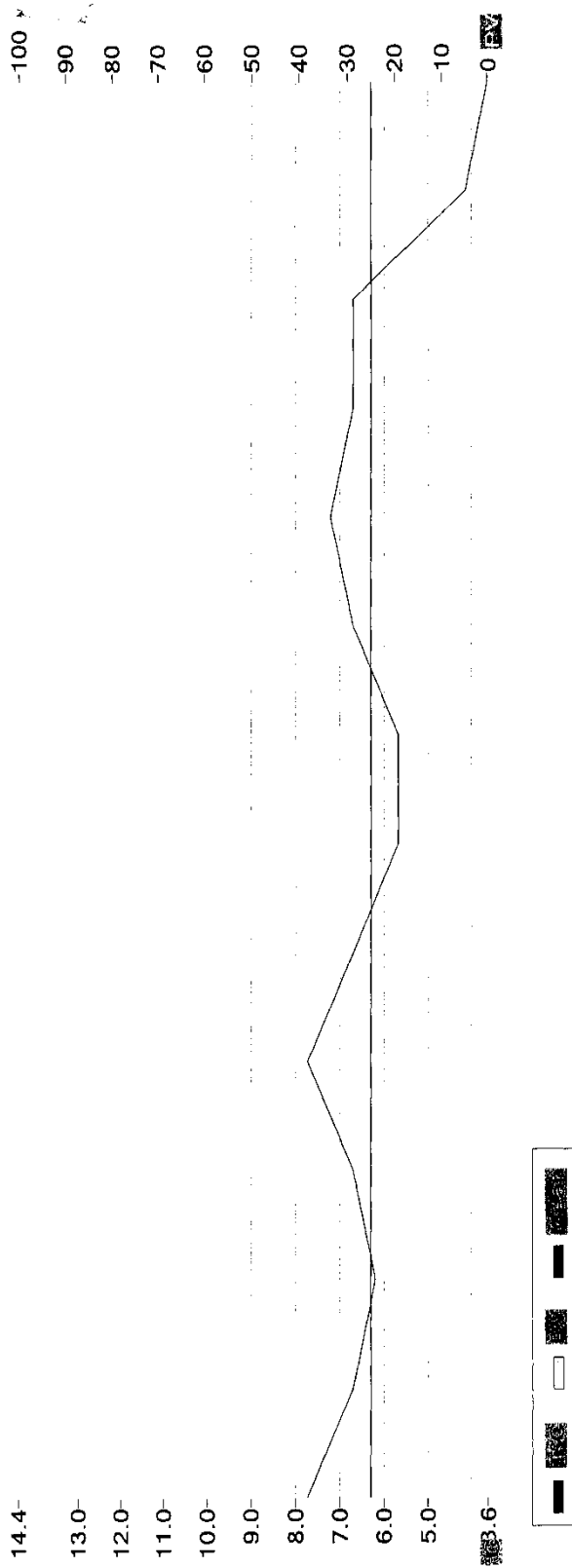
**Anexo 29 - Composição do meio RAPID<sup>®</sup> *Listeria* spp./Agar (www.bio-rad.com)**

**Composição**

• Peptonas	25,0 g
• Extracto de levedura	1,0 g
• Piruvato de sódio	2,0 g
• Citrato de ferro amoniacal	0.5 g
• Maltose	1,0 g
• Cloreto de sódio	4,0 g
• Cloreto de lítio	10,5 g
• Sílica	20,0 g
• Activadores de crescimento	2,0 g
• Mistura cromogénica	75,0 mg
• Mistura de antibióticos	40,0 mg
• Agar	12,0 g
• Água destilada	1 L

(pH 7,0 – 7,5)

**Anexo 30 – Gráfico de monitorização da temperatura da mala térmica**



Probe n° F22540000ADAF21 Description estufa_6					
Record: 06/24/2008 03:10		07/15/2008 10:55		Working interval: 07/15/2008 07:40 - 07/15/2008 10:55	
Mean	6.84	°C	Std. Dev.	1.03	°C
Min	3.61	°C	Max	14.37	°C
			Mean	6.28	°C
			Min	3.61	°C
			Std. Dev.	1.15	°C
			Max	7.71	°C

*Comment*

**Anexo 31 - Composição e modo de preparação do meio BHI ([www.oxid.com](http://www.oxid.com))**

**Composição**

• Infusão de cérebro (bovino)	12,5 g
• Infusão de coração (bovino)	5,0 g
• Peptona	10,0 g
• Cloreto de sódio	5,0 g
• Glucose	2,0 g
• Fosfato dissódico	2,5 g
• Agar	10,0 g
• Água destilada	1 L

**(pH 7,4 ± 0,2)**

**Procedimento**

Suspender 47 gr de meio em 1 L de água destilada. Aquecer a mistura, para que se dissolva completamente. Distribuir em tubos e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 min.

## FICHA DE PROVAS

### Instruções:

1. Prove em primeiro lugar a amostra marcada com o código “253”
2. De seguida, prove a amostra marcada com o código “322”
3. Avalie as diferenças sensoriais entre as duas amostras, utilizando a escala apresentada em baixo.
4. Utilize a escala apresentada para avaliar a dimensão da diferença.

	ESCALA	MARCAR PARA INDICAR A DIFERENÇA
Sem diferença	0	_____
	1	_____
	2	_____
	3	_____
	4	_____
	5	_____
	6	_____
	7	_____
	8	_____
	9	_____
Extremamente diferentes	10	_____

Comentários: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Anexo 33 – Resultados das análises microbiológicas e contaminação**

<b>Código amostra</b>	<b>Marca</b>	<b>Variedade</b>	<b>Prazo validade</b>	<b>Data de Aquisição</b>	<b>Data da análise</b>	<b>Psic.(ufc/gr)</b>	<b>Entero (ufc/gr)</b>	<b>E. coli (ufc/gr)</b>	<b>C. perfringens (ufc/gr)</b>	<b>Listeria spp. (ufc/gr)</b>	<b>B. cereus (ufc/gr)</b>
08-477	F	Cesar	06-03-08	03-03-08	04-03-08	1,4E+07	3,9E+06	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-478	A	Gourmet	06-03-08	03-03-08	04-03-08	1,1E+07	3,4E+05	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-479	F	Gourmet	06-03-08	03-03-08	05-03-08	1,8E+07	1,5E+06	< 4,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-480	F	Gourmet	08-03-08	03-03-08	05-03-08	2,9E+06	1,3E+05	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-481	F	Gourmet	09-03-08	03-03-08	05-03-08	1,1E+07	4,4E+05	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 4,0E+02
08-540	F	Cesar	13-03-08	10-03-08	12-03-08	1,1E+08	2,1E+06	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-541	F	Gourmet	15-03-08	10-03-08	12-03-08	3,2E+06	1,5E+05	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-542	F	Gourmet	28-03-08	25-03-08	25-03-08	4,5E+06	2,9E+05	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-543	A	Gourmet	31-03-08	25-03-08	25-03-08	2,8E+06	2,4E+05	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-544	F	Gourmet	31-03-08	25-03-08	26-03-08	2,3E+06	5,5E+04	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-566	A	Gourmet	31-03-08	25-03-08	26-03-08	7,5E+05	5,2E+04	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-567	A	Gourmet	02-04-08	25-03-08	26-03-08	7,8E+05	1,2E+04	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-745	F	Cesar	19-04-08	14-04-08	16-04-08	1,8E+06	1,0E+05	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-746	F	Gourmet	20-04-08	14-04-08	16-04-08	4,6E+06	4,5E+04	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-938	F	Cesar	08-05-08	05-05-08	06-05-08	2,8E+06	1,2E+05	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-939	F	Gourmet	11-05-08	05-05-08	06-05-08	2,3E+07	1,2E+05	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-940	F	Cesar	14-05-08	12-05-08	13-05-08	3,0E+07	7,7E+06	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-941	F	Cesar	16-05-08	12-05-08	13-05-08	4,3E+06	1,4E+06	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-942	F	Gourmet	18-05-08	12-05-08	13-05-08	8,9E+06	6,8E+05	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-999	F	Cesar	21-05-08	19-05-08	19-05-08	8,7E+05	3,1E+05	< 1,0E+01		< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1000	F	Gourmet	22-05-08	19-05-08	20-05-08	1,6E+07	4,6E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1001	F	Cesar	24-05-08	19-05-08	20-05-08	1,7E+07	> 1,5E+07	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1002	F	Gourmet	25-05-08	19-05-08	20-05-08	2,2E+07	2,0E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1003	A	Gourmet	24-05-08	19-05-08	20-05-08	2,0E+06	9,6E+04	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1055	F	Cesar	29-05-08	27-05-08	28-05-08	5,5E+07	1,1E+07	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1056	F	Gourmet	30-05-08	27-05-08	28-05-08	6,4E+06	1,2E+07	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02

08-1057	F	Cesar	01-06-08	27-05-08	28-05-08	3,9E+07	> 1,5E+07	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1058	A	Gourmet	04-06-08	27-05-08	28-05-08	1,4E+06	6,6E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1059	F	Cesar	04-06-08	27-05-08	28-05-08	4,6E+04	2,0E+04	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1095	A	Gourmet	04-06-08	27-05-08	28-05-08	2,1E+07	1,0E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1096	F	Gourmet	04-06-08	27-05-08	28-05-08	1,9E+06	6,0E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1097	A	Gourmet	09-0'6-08	03-06-08	03-06-08	3,3E+06	6,9E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1098	A	Gourmet	11-06-08	03-06-08	03-06-08	2,9E+06	2,8E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1257	F	Cesar	22-06-08	16-06-08	18-06-08	1,5E+06	8,4E+04	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1258	F	Cesar	27-06-08	23-06-08	24-06-08	3,0E+06	7,5E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1259	A	Gourmet	28-06-08	23-06-08	24-06-08	1,3E+07	1,2E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1260	Q	Mescla	04-07-08	30-06-08	01-07-08	5,2E+06	5,1E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 4,0E+02
08-1261	Q	Ibèria	04-07-08	30-06-08	01-07-08	4,8E+05	1,2E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 4,0E+02
08-1262	Q	Gourmet	04-07-08	30-06-08	01-07-08	8,9E+06	3,2E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	6,0E+02
08-1263	Q	Camponesa	04-07-08	30-06-08	01-07-08	2,1E+08	8,1E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	1,4E+03
08-1264	Q	Mista com fruits secs	04-07-08	30-06-08	01-07-08	3,7E+06	1,4E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1309	Q	Ibèria	09-07-08	07-07-08	08-07-08	2,7E+06	1,2E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 4,0E+02
08-1310	Q	Mescla	10-07-08	07-07-08	08-07-08	1,9E+07	3,6E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	7,0E+02
08-1311	Q	Ibèria	10-07-08	07-07-08	08-07-08	2,7E+05	3,0E+04	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 4,0E+02
08-1312	Q	Ibèria	11-07-08	07-07-08	08-07-08	5,9E+05	3,7E+04	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	1,6E+03
08-1416	Q	Mescla	18-07-08	15-07-08	15-07-08	1,7E+06	1,6E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1417	Q	Mescla	20-07-08	15-07-08	15-07-08	1,8E+06	1,5E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1418	Q	Ibèria	20-07-08	15-07-08	15-07-08	8,2E+05	2,0E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1419	Q	Ibèria	23-07-08	21-07-08	23-07-08	1,7E+07	8,4E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	1,5E+03
08-1420	Q	Mescla	23-07-08	21-07-08	23-07-08	3,7E+07	4,9E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1466	Q	Mescla	30-07-08	28-07-08	29-07-08	> 3,0 E+08	3,7E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1467	Q	Mescla	31-07-08	28-07-08	29-07-08	6,8E+07	1,6E+06	2,2E+02	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1468	Q	Ibèria	31-07-08	28-07-08	29-07-08	5,5E+07	1,3E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1469	Q	Ibèria	01-08-08	28-07-08	29-07-08	1,7E+06	1,9E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02

08-1490	Q	Mescla	07-08-08	04-08-08	05-08-08	1,5E+08	7,2E+07	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 4,0E+02	< 1,0E+02
08-1491	Q	Gourmet	07-08-08	04-08-08	05-08-08	3,5E+07	5,5E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1492	Q	Mescla	08-08-08	04-08-08	05-08-08	5,9E+06	4,8E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1493	Q	Gourmet	08-08-08	04-08-08	05-08-08	2,9E+07	9,1E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1494	Q	Ibèria	08-08-08	04-08-08	05-08-08	4,3E+06	8,0E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1530	Q	Mescla	13-08-08	11-08-08	12-08-08	1,7E+08	3,9E+07	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1531	Q	Mescla	14-08-08	11-08-08	12-08-08	4,2E+07	2,2E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1532	Q	Ibèria	14-08-08	11-08-08	12-08-08	7,7E+07	4,4E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1533	Q	Gourmet	14-08-08	11-08-08	12-08-08	8,0E+07	1,3E+07	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1561	Q	Ibèria	21-08-08	18-08-08	19-08-08	3,7E+07	1,2E+07	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1562	Q	Mescla	21-08-08	18-08-08	19-08-08	7,5E+07	7,2E+06	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 4,0E+02
08-1563	Q	Gourmet	22-08-08	18-08-08	19-08-08	2,1E+07	8,6E+05	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 1,0E+02
08-1564	Q	Ibèria	22-08-08	18-08-08	19-08-08	1,6E+05	5,5E+03	< 1,0E+01	< 1,0E+01	< 1,0E+02	< 4,0E+02

Código amostra	Pesq. B.cereus	A. hydrophila (ufc/gr)	Pesq. L. monocytogenes	Pesq. Salmonella spp.	Pesq. E. coli O157: H7	Dias de armaz. cont.	Cont.inicial (1/2a) (ufc/gr)	Cont. final (1/2a) (ufc/gr)
08-477		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-478		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-479		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-480		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-481		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-540		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-541		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-542		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-543		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-544		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			

08-566		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-567		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-745		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-746		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-938		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-939		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-940		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-941		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-942		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-999		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1000		< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1001	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1002	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1003	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1055	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1056	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1057	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1058	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1059	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1095	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1096	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1097	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1098	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1257	Ausência	> 1,5E+05	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1258	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1259	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo			
08-1260	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	2,2E+04	1,5E+04
08-1261	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	3,1E+04	1,7E+04
08-1262	Presença	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	3,2E+04	2,8E+04

08-1263	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	2,4E+04	2,1E+04
08-1264	Presença	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	1,7E+04	9,2E+03
08-1309	Presença	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	1	1,2E+04	5,8E+03
08-1310	Presença	< 1,0E+02	Negativo	Positivo	Negativo	1	7,2E+03	3,0E+03
08-1311	Presença	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	1	6,3E+03	4,0E+03
08-1312	Presença	< 1,0E+02	Negativo	Positivo	Negativo	2	5,3E+03	2,2E+03
08-1416	Presença	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	2	1,7E+04	1,4E+04
08-1417	Presença	< 1,0E+02	Positivo	Positivo	Negativo	5	1,2E+04	1,8E+04
08-1418	Presença	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	5	1,1E+04	8,5E+04
08-1419	Ausência	6,7E+04	Negativo	Negativo	Negativo	1	6,7E+03	8,0E+03
08-1420	Presença	> 1,5E+05	Negativo	Negativo	Negativo	1	8,9E+03	6,0E+03
08-1466	Ausência	> 1,5E+05	Negativo	Negativo	Positivo	1		
08-1467	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	2		
08-1468	Ausência	> 1,5E+05	Negativo	Negativo	Negativo	2		
08-1469	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3		
08-1490	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	3,6E+03	2,2E+03
08-1491	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Positivo	3	2,4E+03	7,3E+02
08-1492	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	2,8E+03	1,4E+03
08-1493	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	1,9E+03	6,3E+03
08-1494	Ausência	> 1,5E+05	Negativo	Negativo	Positivo	3	2,4E+03	1,3E+04
08-1530	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	2	3,6E+02	4,5E+02
08-1531	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	2	7,3E+02	3,6E+02
08-1532	Ausência	> 1,5E+05	Negativo	Negativo	Negativo	2	8,2E+02	2,7E+02
08-1533	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	2	7,3E+02	2,7E+02
08-1561	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	1,0E+05	1,0E+05
08-1562	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	7,8E+04	1,8E+05
08-1563	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	7,8E+04	3,5E+05
08-1564	Ausência	< 1,0E+02	Negativo	Negativo	Negativo	3	5,2E+04	1,7E+05

<b>Código amostra</b>	<b>Cont.inicial (4b) (ufc/gr)</b>	<b>Cont. final (4b) (ufc/gr)</b>
08-1416	2,1E+03	3,5E+03
08-1417	1,6E+03	2,4E+03
08-1418	1,9E+03	2,6E+03
08-1419	4,9E+03	4,6E+03
08-1420	5,5E+04	3,9E+03
08-1466	4,3E+03	1,1E+04
08-1467	4,6E+03	1,4E+04
08-1468	5,0E+03	2,3E+04
08-1469	3,7E+03	7,3E+03
08-1490	1,5E+03	1,1E+03
08-1491	7,3E+02	6,4E+02
08-1492	7,3E+02	4,5E+02
08-1493	1,0E+03	2,8E+03
08-1494	9,1E+02	3,1E+03
08-1530	1,5E+04	1,5E+04
08-1531	1,4E+04	9,7E+03
08-1532	1,1E+04	1,4E+04
08-1533	1,3E+04	9,7E+03
08-1561	2,9E+04	8,4E+04
08-1562	4,5E+04	4,3E+04
08-1563	3,6E+04	3,5E+04
08-1564	4,1E+04	5,0E+05