

Relatório de Estágio Curricular Laboratório BR – Análises Ambientais e Alimentares, Lda.

Beatriz Barata Pereira

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Pedro Miguel de Mendonça Rocha

junho de 2024

Folha em branco

Declaração de Integridade

Eu, Beatriz Barata Pereira, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M12654 de Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 10 /06 /2024

Folha em branco

Agradecimentos

Depois de cinco anos, chega agora ao fim um caminho que me realizou enquanto pessoa, numa área que adoro. Esta foi uma viagem extremamente feliz, apesar das dificuldades, e sinto que devo hoje agradecer a todos os que estiveram presentes na minha vida durante este tempo, contribuindo de algum modo para a concretização deste percurso e ajudando-me a vencer as adversidades.

Em primeiro lugar, agradeço à Universidade da Beira Interior e a todos os seus docentes e funcionários por proporcionarem a possibilidade de efetuar a minha licenciatura e mestrado, espero que no futuro continuem a ser a casa de formação de muitos Bioquímicos.

Ao Professor Pedro Rocha, obrigada por me aceitar como sua orientanda, por me disponibilizar o laboratório para poder efetuar o estágio curricular e por toda a atenção e disponibilidade na ajuda à concretização deste relatório.

À equipa do laboratório, Drs. Celina Reis, Rui Coca, Estela Caldeira e Rui Oliveira, agradeço do fundo do coração pela forma como me acolheram, fazendo-me sentir em casa, e por todo o apoio, ajuda, orientação, ensinamentos e conselhos que levarei para a vida. Vocês eram a razão por que todos os dias eu entrava motivada por aquela porta, nunca vou esquecer os momentos que partilhámos.

Aos meus pais, que desde sempre estiveram lá para mim em todas as circunstâncias, apoiando-me nos bons e maus momentos, que acreditaram profundamente em mim e não me deixaram desistir, mesmo quando eu achei que não aguentava. Não há obrigados suficientes no mundo para vocês e para a vossa paciência, amor e carinho.

Aos meus avós, que sempre fizeram tudo por mim ao longo de todo o meu percurso académico e sempre foram um dos meus abrigos, inspirando-me com a sua força e o seu orgulho, que sinto todos os dias no meu coração.

A toda a restante família, que felizmente são demasiadas pessoas para conseguir nomear, um grande obrigada por todas as palavras, preocupação, apoio e motivação que sempre me ofereceram.

À Neuza, que mais que uma amiga, foi uma irmã que Bioquímica me deu, obrigada por todos os momentos que partilhámos, todas as histórias, sorrisos e lágrimas (principalmente de rir até não poder mais)... vê hoje onde chegámos! Obrigada por teres feito esta viagem juntamente comigo e por me fazeres ver que é possível ultrapassar todos os nervos.

Ao Jorge, o terceiro elemento do melhor grupo do mundo, sem dúvida para mim uma fonte de confiança cega. Os nossos trabalhos incríveis (e sempre entregues a escaldar) foram de certeza uma das razões pelas quais consegui terminar este curso com sucesso.

À Sofia e à Inês, sabem que para mim vocês também já são família. Obrigada por me acompanharem em tudo, por me apoiarem e sempre se preocuparem comigo, mesmo quando parecia que estava atolada em stress e não conseguia ver mais nada. Agradeço muito pelas palavras de conforto e por toda a alegria que temos vindo a partilhar desde que nos conhecemos.

À Océ, a mais “antiga”, não há palavras suficientes para descrever a amizade que, mesmo a 1800 km de distância, mantemos até hoje. Obrigada por seres sempre aquela com quem posso contar, qualquer que seja a situação em que estou, e que me apoia e me motiva para tudo, fazendo-me perceber que posso atingir tudo o que quero.

Um obrigada adicional a todos os demais meus amigos, que longe ou perto foram parte integrante desta jornada e contribuíram para me tornar na pessoa que sou hoje.

Resumo

Os laboratórios de análises alimentares e ambientais são um dos elementos principais dos sistemas de controlo de qualidade e segurança de alimentos, águas, solos e ar, sistemas esses de importância crescente, face às infeções que todos os anos surgem como consequência de produtos contaminados e às exigências dos consumidores, que esperam a maior qualidade possível desses produtos.

O presente documento constitui um relatório acerca do meu estágio curricular, com duração de cerca de 8 meses, que decorreu num destes laboratórios – o laboratório BR – Análises Ambientais e Alimentares, Lda. – e alguns dos seus focos principais são a caracterização geral da empresa anfitriã, dando destaque à sua divisão pelos setores de Físico-Química e Microbiologia, e a descrição detalhada das atividades desenvolvidas na área da Microbiologia, isto é, todos os procedimentos e tipos de ensaios microbiológicos efetuados, fornecendo uma base teórica sobre os mesmos. É ainda feita uma análise estatística acerca da quantidade de amostras e de parâmetros analisados e, por fim, apresenta-se um estudo sobre a bactéria *Escherichia coli* baseado em alguns dos resultados obtidos no decurso do estágio, que teve duas vertentes: a deteção desta bactéria em queijos de uma queijaria da região, para determinar a capacidade de otimização do processo de higiene da mesma, e a sua deteção em águas provenientes de furos particulares, a fim de avaliar em que medida é seguro consumir este tipo de água.

Palavras-chave

Controlo de qualidade e segurança; Microbiologia; Alimentos; Águas; *Escherichia coli*

Folha em branco

Abstract

Food and environmental analysis laboratories are one of the main elements of food products, water, soil and air quality and safety control systems, which possess increasing importance, given the infections that surge every year as a consequence of contaminated products and the demands of the consumers, who expect the best possible level of quality from those products.

This document consists of a report about my curricular internship, with a duration of about 8 months, at one of these laboratories – BR – Análises Ambientais e Alimentares, Lda. Laboratory – and some of its points of focus are the general characterization of the host company, highlighting its division into the Physics and Chemistry and the Microbiology sectors, and the detailed description of the activities performed in the Microbiology area, that is, all carried out procedures and types of microbiological tests, providing a theoretical basis for them. A statistical analysis about the number of analysed samples and parameters is also executed and, finally, a study on the bacteria *Escherichia coli*, based on some of the results obtained during the internship and which had two main goals: the detection of this bacteria in cheeses from a regional cheese plant, for the determination of its process hygiene optimization, and its detection in water samples from particular boreholes, so as to evaluate how safe it is to consume this type of water, is presented.

Keywords

Quality and safety control; Microbiology; Food; Water; *Escherichia coli*

Folha em branco

Índice

1. Introdução	1
2. Caracterização do laboratório	3
2.1. Setor de Microbiologia	4
2.2. Setor de Físico-Química	5
2.3. Áreas comuns	6
3. Atividades desenvolvidas	7
3.1. Considerações gerais em Microbiologia	7
3.2. Recolha de amostras	7
3.2.1. Procedimento	8
3.3. Os meios de cultura	9
3.4. Suspensão inicial e diluições decimais das amostras	13
3.5. Cálculo e expressão de resultados	13
3.6. Os parâmetros analisados	15
3.6.1. Enumeração de microrganismos a 30°C	15
3.6.2. Enumeração de microrganismos a 22°C ou 37°C	16
3.6.3. Enumeração de <i>Enterobacteriaceae</i>	16
3.6.4. Enumeração de coliformes	17
3.6.5. Enumeração de <i>Escherichia coli</i> β-glucoronidase positiva	18
3.6.6. Detecção e enumeração de <i>Enterococcus</i> spp.	20
3.6.7. Enumeração de <i>Staphylococcus</i> spp.	21
3.6.8. Detecção de <i>Salmonella</i> spp.	23
3.6.9. Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> e outras <i>Listeria</i> spp.	25
3.6.10. Enumeração de bolores e leveduras	26
3.6.11. Detecção e enumeração de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
3.6.12. Enumeração de <i>Clostridium perfringens</i>	28
3.7. Os produtos e análises mais frequentes	29
3.8. Dados estatísticos das atividades desempenhadas	30
4. Estudo – Análise da presença de <i>Escherichia coli</i> em queijos e águas de consumo	33
4.1. Objetivos	33
4.2. Introdução	33

4.3. Métodos	35
4.3.1. Análise de <i>E. coli</i> em queijos	35
4.3.2. Análise de <i>E. coli</i> em águas de consumo	36
4.4. Resultados	37
4.4.1. Análise de <i>E. coli</i> em queijos	37
4.4.2. Análise de <i>E. coli</i> em águas de consumo	41
4.5. Discussão	43
4.6. Conclusão	46
5. Conclusões	47
6. Bibliografia	49

Lista de Figuras

- Figura 1. – Placas de meio não seletivo, onde se verificou crescimento microbiano. À esquerda, uma placa com mais de 300 colônias, à direita uma placa com 63 colônias.
- Figura 2. – Placa de CCA com colônias típicas de bactérias coliformes.
- Figura 3. – Placa de TBX onde se observa o crescimento de mais de 150 colônias típicas de *E. coli*.
- Figura 4. – Placa de CCA com colônias típicas de *Escherichia coli*.
- Figura 5. – Placa de S&B com colônias típicas de *Enterococcus* spp.
- Figura 6. – Placa de BP-RPF com colônias típicas de *Staphylococcus* coagulase-positiva, neste caso *S. aureus*.
- Figura 7. – Placa de MSA com 3 colônias típicas de *Staphylococcus* spp., observadas sobre e sob a membrana, respetivamente à esquerda e à direita.
- Figura 8. – Placa de *CHROMagar™ Salmonella Plus* com colônias típicas de *Salmonella* spp. Estão assinaladas com 1 e 2 duas colônias isoladas.
- Figura 9. – Teste API 32E: conjunto de poços com testes bioquímicos usados para confirmação de *Salmonella* spp.
- Figura 10. – Placa de OCLA com colônias típicas de *Listeria monocytogenes*.
- Figura 11. – Placa de PS:CN com colônias típicas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Figura 12. – Teste da fosfatase ácida com resultados positivos (setas verdes) e negativos (setas laranja).
- Figura 13. – Representação gráfica da quantidade de amostras analisadas de cada tipo.
- Figura 14. – Representação gráfica do número de determinações analíticas efetuadas e respetiva distribuição por cada parâmetro.
- Figura 15. – Gráfico da distribuição dos queijos analisados quanto à concentração de *Escherichia coli*.
- Figura 16. – Evolução da percentagem de queijos cujos níveis de *E. coli* são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g.
- Figura 17. – Evolução da percentagem de queijos simples cujos níveis de *E. coli* são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g.
- Figura 18. – Evolução da percentagem de queijos apimentados cujos níveis de *E. coli* são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g.
- Figura 19. – Evolução da percentagem de queijos de especiarias cujos níveis de *E. coli* são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g.
- Figura 20. – Evolução da percentagem de queijos picantes cujos níveis de *E. coli* são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g.
- Figura 21. – Evolução da percentagem de queijos de mistura cujos níveis de *E. coli* são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g.
- Figura 22. – Gráfico da contabilização das águas analisadas quanto à presença de *E. coli* e outras bactérias coliformes.

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1. – Critérios para a interpretação dos resultados microbiológicos obtidos em cada amostra, relativamente à quantidade de *E. coli* presente.

Tabela 2. – Distribuição das amostras correspondentes aos vários tipos de queijo pelos dias em que foram recebidas no laboratório.

Tabela 3. – Nível de contaminação das águas analisadas, em termos de quantidade de coliformes totais e de *E. coli*.

Folha em branco

Lista de Acrónimos

ALOA	<i>Agar Listeria Ottaviani and Agosti</i>
API	<i>Analytical Profile Index</i>
a_w	Atividade da água
BEAA	<i>Bile Esculin Azide Agar</i>
BP	<i>Baird Parker Agar</i>
BP-RPF	<i>Baird Parker + Rabbit Plasma Fibrinogen Agar</i>
CBO ₅	Carência Bioquímica de Oxigénio ao fim de 5 dias
CCA	<i>Chromogenic Coliforms Agar</i>
CE	Conformidade Europeia
CQO	Carência Química de Oxigénio
EN	<i>European Norm</i>
ETAR(s)	Estação(ões) de Tratamento de Águas Residuais
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IPSS	Instituições Particulares de Solidariedade Social
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MKTTn	<i>Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth</i>
MPCA	<i>Milk Plate Count Agar</i>
MR	<i>Maximum Recovery Diluent</i>
MSA	<i>Mannitol Salt Agar</i>
NF	<i>Norme Française</i>
NP	Norma Portuguesa
OCLA	<i>Oxid Chromogenic Listeria Agar</i>
PALCAM	<i>Polymyxin Acriflavin Lithium-chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol Agar</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PME	Pequenas e Médias Empresas
PS:CN	<i>Pseudomonas + Cetrimide & Nalidixic Acid Agar</i>
PWT	<i>Buffered Peptone Water</i>
RB	<i>Rose Bengal Chloramphenicol Agar</i>
RPF	<i>Rabbit Plasma Fibrinogen</i>
RVS	<i>Rappaport-Vassiliadis Salmonella Broth</i>
S&B	<i>Slanetz & Bartley Agar</i>
TBX	<i>Tryptone Bile X-Glucoronide Agar</i>
TSC	<i>Tryptose Sulfite Cycloserine Agar</i>
UE	União Europeia
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UV	Ultravioleta
VRBG	<i>Violet Red Bile Glucose Agar</i>
VRBL	<i>Violet Red Bile Lactose Agar</i>
XLD	<i>Xylose Lysine Deoxycholate</i>

Folha em branco

1. Introdução

A segurança alimentar é um tópico que requer um alto nível de atenção, dada a preocupante ameaça que as infeções causadas por alimentos representam para a saúde pública e para a economia¹. De facto, todos os anos surgem surtos que estão na base de milhões de casos deste tipo de infeções que originam milhares de mortes em todo o mundo². Para além de alarmante, este facto urge como preocupante, bastando reportar aos dados do último relatório de zoonoses da União Europeia (UE), referente ao ano 2022: segundo esse documento, só na UE o número de mortes associados a surtos de doenças com origem em alimentos foi o maior dos 10 anos anteriores³. Os microrganismos naturalmente presentes nos alimentos, cuja quantidade e tipos difere de acordo com o tipo de produto, procedimentos de higiene aplicados e modos de processamento, transporte e armazenamento, assim como a crescente vulnerabilidade populacional, constituem a causa primária deste tipo de patologias⁴.

A par dos alimentos, a água é um bem essencial de consumo humano, fundamental para a homeostasia do organismo e sendo o seu constituinte maioritário. Estando assim cientes da sua importância, também nos alerta o facto de que microrganismos presentes nos reservatórios de água, para além de terem um papel ativo na reciclagem de nutrientes, são vetores de infeções que representam perigos para a saúde, sendo especialmente preocupantes os microrganismos indicadores de contaminação fecal, cuja presença determina que a respetiva água é insegura para consumo humano⁵.

Para controlar o tipo e quantidade de microrganismos presentes em produtos destinados ou relacionados com o consumo humano, contribuindo simultaneamente para a prevenção das patologias a eles associadas e garantia geral da saúde pública, é de extrema importância a implementação de sistemas de HACCP, que se baseiam nos princípios da prevenção, análise e correção de potenciais perigos. Os laboratórios de análises alimentares e ambientais são uma das peças-chave destes sistemas, uma vez que são a contribuição principal para o segundo princípio, isto é, fornecem a informação (associada às análises efetuadas e respetivos resultados) utilizada para verificar em que nível a prevenção é eficaz e para controlar ou corrigir qualquer desvio da conformidade, que significa um perigo para os consumidores.

O presente relatório visa retratar em detalhe o meu estágio curricular na empresa BR – Análises Ambientais e Alimentares, Lda., um laboratório líder da região na área das análises para controlo da segurança alimentar e ambiental, estágio este que teve como objetivos a aquisição de conhecimentos mais aprofundados na área da Microbiologia de alimentos e águas, assim como a aplicação desses conhecimentos teóricos num contexto prático laboratorial, fornecendo uma base de preparação para o futuro profissional. Durante este estágio desempenhei várias atividades, incluindo a recolha de amostras, a respetiva preparação, a análise microbiológica e a interpretação de resultados, o que me permitiu servir como uma peça na engrenagem cujo objetivo é a prevenção e mitigação de todo o tipo de riscos associados a contaminação de alimentos e águas.

2. Caracterização do laboratório

O laboratório BR-Análises Ambientais e Alimentares, Lda. é um estabelecimento acreditado, cuja área principal de atuação é o controlo de qualidade nas áreas ambiental e alimentar. Este é um laboratório de referência na região da Cova da Beira, aberto de segunda a sexta-feira das 9h às 18h, e está localizado na cidade da Covilhã, mais especificamente na Rua Peso da Lã, Nº 11, R/C, sendo administrado pelo Dr. José Luís de Brito Rocha e cujo diretor é o Prof. Dr. Pedro Rocha.

As instalações do laboratório abriram em 2000 sob o nome Laboratório de Análises Ambientais, Alimentares e Águas, estando, nessa altura, ligado ao Laboratório Brito Rocha, Lda., de análises clínicas. Em março de 2009, a BR-Análises Ambientais e Alimentares, Lda. separou-se deste último, passando a funcionar como uma empresa independente. Desde a sua génese que este laboratório é especializado na análise de vários parâmetros microbiológicos e químicos numa variada gama de amostras, nomeadamente e com maior frequência alimentos, águas, superfícies, manipuladores, ar e solos. Devido à estreita ligação com a Universidade da Beira Interior através do seu diretor, que é docente nesta instituição, o laboratório integra a mais-valia da vertente de investigação com o apoio a projetos de curso, mestrados e doutoramentos. As instalações encontram-se divididas em dois setores principais, cada qual com a sua área designada no interior das mesmas; são estes o setor de Microbiologia e o setor de Físico-Química, sendo as atividades desempenhadas em cada um deles detalhadas mais à frente. É ainda de sublinhar que, para além dos referidos serviços prestados, também é disponibilizado o serviço de recolha das amostras, garantindo uma maior comodidade dos clientes.

Este laboratório enquadra-se numa PME, contando com uma equipa de 4 técnicos superiores formados na Universidade da Beira Interior e especializados nas respetivas área, sempre atualizados através de constante formação.

Dadas as garantias de qualidade dos serviços prestados, o laboratório BR – Análises Ambientais e Alimentares, Lda. possui uma vasta variedade de clientes, que se distribuem um pouco por todo o país, designadamente empresas que se inserem principalmente na área alimentar, como restaurantes, empresas de catering, padarias, salsicharias, talhos ou queijarias, mas também outro tipo de empresas, como Centros Sociais, IPSS, hotéis e ainda ETARs, para além de ter parcerias com diversas entidades, como câmaras municipais, e de ser um parceiro habitual de empresas que prestam serviços de HACCP.

O estágio curricular descrito no presente relatório ocorreu nas instalações do laboratório BR-Análises Ambientais e Alimentares, Lda. dado o âmbito das análises neste efetuadas, que está profundamente ligado à área da Bioquímica, tendo as atividades decorrido, mais especificamente, no laboratório de Microbiologia.

2.1. Setor de Microbiologia

O espaço destinado ao laboratório de Microbiologia encontra-se dividido em diferentes áreas, consoante o tipo de procedimento, sendo que, para uma melhor organização, cada uma delas possui bancadas identificadas adequadamente em função disso. Uma dessas zonas é a de preparação dos meios de cultura, possuindo duas bancadas para o efeito: uma está equipada com uma balança e é o local onde se faz a pesagem dos meios desidratados, adição da água destilada e distribuição dos meios por placas para solidificação, a outra possui uma placa de agitação e aquecimento e um banho de aquecimento, sendo o local onde se derretem os meios, se faz a sua homogeneização e se estabilizam à temperatura apropriada. Nesta zona também se encontra um autoclave, para esterilização dos meios de cultura e do material de laboratório. Outra área é destinada à filtração de amostras de águas e inoculação das membranas usadas, tendo, por isso, uma bancada com um sistema de filtração a vácuo *manifold* e um bico de Bunsen. Neste laboratório existe ainda uma zona com uma bancada para preparação das amostras, outra para preparação de amostras, inóculos e distribuição de meios de cultura (equipada com uma balança, um *Stomacher* e um bico de Bunsen) e uma terceira para inóculos, distribuição de meios de cultura e repicagens de amostras incubadas (equipada com um bico de Bunsen e um *vortex*). Existem ainda mais alguns equipamentos neste setor, entre eles três frigoríficos para armazenamento de meios de cultura e reagentes, quatro estufas (cada uma programada para um intervalo de temperatura diferente – $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$, $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$, $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ e $(44\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$), um banho programado para temperatura de $(41,5\pm 1)^{\circ}\text{C}$ e uma câmara de fluxo laminar, para além de vários armários e gavetas de arrumação de material diverso que não necessite de refrigeração.

O laboratório tem uma variada oferta de análises microbiológicas que se realizam neste setor e incluem análises a alimentos, águas (de consumo, naturais doces – termais – e de piscina), esfregaços de superfícies, esfregaços de manipuladores e ar ambiente. Em alimentos e amostras ambientais na área alimentar é possível fazer as análises de enumeração de microrganismos totais a 30°C , enumeração de bolores e leveduras, *Enterobacteriaceae*, coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase-positiva e *Clostridium perfringens*, deteção e enumeração de *Listeria monocytogenes* e outras

espécies de *Listeria* e detecção de *Salmonella* e *Clostridia* sulfito-redutores. Em águas faz-se a enumeração de microrganismos totais a 22°C, bactérias coliformes, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* e detecção de *Legionella*. Este último parâmetro também é analisado em amostras de ar ambiente. Oito destas análises constam do âmbito da acreditação do laboratório pelo IPAC, cumprindo a norma NP EN ISO/IEC 17025⁶, sendo elas a quantificação de *Clostridium perfringens* em águas de consumo, as quantificações de bactérias coliformes, *Enterococcus* e *Escherichia coli* em águas de consumo, naturais doces (termais) e de piscinas, a quantificação de microrganismos totais a 30°C em géneros alimentícios, a quantificação de microrganismos totais a 30°C em esfregaços de superfícies, a detecção de *Salmonella* spp. em géneros alimentícios e a quantificação de *Escherichia coli* em géneros alimentícios.

2.2. Setor de Físico-Química

A base da organização do laboratório de Físico-Química são as bancadas, não divididas de forma rígida, mas em que as diferentes fases dos vários procedimentos se efetuam em diferentes zonas das mesmas, conforme a disposição dos equipamentos. Entre estes pode contar-se um sistema de filtração a vácuo, duas placas de agitação e aquecimento, um *vortex*, um medidor de pH e condutividade, um espectrofotómetro, um digestor, um medidor de oxigénio dissolvido, um aparelho analisador automático de diversos parâmetros em leites, um aparelho analisador automático exclusivo para as células somáticas em leites, um *foodscan* (aparelho de espectroscopia de infravermelhos que fornece resultados de alguns valores nutricionais de alimentos), um aparelho de espectroscopia de absorção atómica, um purificador de água para obtenção de água ultrapura e uma balança analítica. Neste laboratório existe ainda uma *hotte*, equipada com um bico de Bunsen, e diversos armários de arrumação para material, soluções e reagentes. Existe ainda uma divisão nas instalações que serve de apoio ao laboratório de Físico-Química, na qual se encontram duas mantas de aquecimento acopladas a uma montagem refrigerada para efetuar refluxos e destilações, uma estufa que cumpre o intervalo de temperatura (104±1)°C, uma estufa refrigerada programada para (22±2)°C, uma mufla, um banho de aquecimento e um forno de microondas.

Existe uma miríade de análises físico-químicas que são efetuadas neste setor do laboratório, sendo as amostras analisadas de três tipos: alimentos, solos (inclui solos, composto orgânico e lamas) e águas (que podem ser de consumo, de piscina, naturais, de ETAR ou residuais). Em alimentos efetua-se com bastante regularidade um conjunto

de análises que definem o seu rótulo alimentar e que incluem a determinação do valor energético, açúcares totais, redutores e invertidos, hidratos de carbono, fibras, teor de sal, sódio, proteína total, lípidos totais, humidade e cinzas. Faz-se para além disto a análise de outros parâmetros, como a deteção de alergénios e as determinações do extrato seco, colagénio, lactose, nitratos, nitritos, fosfatos, cloretos, acidez (em leites, queijos e azeite), pH, índice de peróxidos, atividade da água (a_w), compostos polares e índice crioscópico (em leite). Em solos são feitas análises da granulometria, condutividade, pH, humidade, densidade aparente compactada, massa volúmica aparente, massa volúmica real, matéria seca (a 105°C), teor de matéria orgânica, materiais inertes, teor de cinzas, carbono orgânico total, azoto total (azoto de Kjeldahl), fósforo total, fósforo total extraível, grau de maturação, enxofre total, enxofre total inorgânico, fitotoxicidade, índice relativo de germinação, boro, razão C/N e diferentes metais e minerais. Nas águas de consumo, de piscina, naturais e de ETAR, é possível fazer a determinação de fosfatos, fósforo total, metais e minerais, nitratos, nitritos, óleos e gorduras, oxidabilidade, oxigénio dissolvido, pH, sabor, sílica, sólidos (incluindo sólidos suspensos totais), sulfatos, temperatura e turvação. Já para águas residuais, os parâmetros analisados com maior regularidade são a temperatura, o pH, a CQO, a CBO₅, o fósforo total, o azoto total, detergentes aniónicos, óleos e gorduras, sólidos suspensos totais, nitratos e diversos metais e minerais. Destas análises, duas cumprem os requisitos de acreditação segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025⁶, sendo elas a determinação do pH em águas de consumo, de piscina e residuais e a determinação dos sólidos suspensos totais em águas residuais.

2.3. Áreas comuns

Para além dos espaços dedicados à realização dos ensaios microbiológicos e físico-químicos, existem ainda algumas áreas comuns, partilhadas pelo pessoal de ambos os setores. Entre estas, destacam-se uma área equipada com uma arca congeladora e dois frigoríficos (um para armazenamento de amostras pré-análise e em processo de análise e outro para armazenamento de amostras processadas), uma área designada para as lavagens de material e para separação e descontaminação do lixo e uma área contendo uma bancada para a receção das amostras. Separadas da parte destinada a todo o trabalho que lida diretamente com amostras e material de laboratório, existem ainda mais três zonas comuns, sendo elas o gabinete do diretor técnico, a área administrativa e o WC.

3. Atividades desenvolvidas

Nesta seção pretende-se detalhar todas as atividades decorridas, assim como todos os parâmetros que foram determinados no decorrer do presente estágio, fornecendo ainda uma base teórica para os mesmos.

3.1. Considerações gerais em Microbiologia

As análises microbiológicas são apenas uma das fases de todo um processo que leva à emissão de um resultado final, que dá a conhecer a possível contaminação de uma amostra, assim como a extensão dessa contaminação. Esse processo engloba, para além das análises, a amostragem, transporte das amostras, receção das amostras, redação do relatório e emissão dos resultados. Todas estas fases deverão obedecer a certas regras, a fim de que se possam cumprir os dois objetivos mais importantes das análises nesta área, isto é, que apenas os microrganismos presentes nas amostras são isolados e enumerados e que esses microrganismos não contaminam o ambiente.

As regras a seguir são, fundamentalmente, do âmbito da higiene e segurança, tanto do laboratório como do pessoal, material, equipamento, ensaios e das amostras em si, devendo sempre ser seguidas, de modo a manter a qualidade e confiança nos resultados e contribuindo, ao mesmo tempo, para a manutenção da saúde pública. Estas medidas estão descritas detalhadamente na norma ISO 7218:2007⁷ e todas as atividades desempenhadas ao longo do estágio foram efetuadas de forma a garantir o seu cumprimento.

3.2. Recolha de amostras

A recolha das amostras não é sempre efetuada por técnicos do laboratório, acontecendo com alguma frequência as amostras chegarem às instalações por correspondência ou serem entregues em mão pelo respetivo cliente, embora o ato da recolha seja sempre o primeiro passo para qualquer tipo de análise, sendo necessário alguns cuidados para que haja o mínimo de interferências possível no resultado obtido. Na área da Microbiologia estes cuidados são de extrema importância e a atenção deverá ser redobrada, uma vez que qualquer objeto ou material biológico que não tenha passado pelo processo de esterilização pode constituir uma fonte de contaminação.

No âmbito deste estágio, a recolha de amostras foi realizada uma vez em quatro locais distintos, entre eles três hotéis e um restaurante. No seu todo, foram recolhidas 5 amostras de esfregaços a mãos, 6 de esfregaços a superfícies, 3 de esfregaços a ralos, 3 de alimentos prontos-a-comer e 4 de águas de consumo.

3.2.1. Procedimento

Para a recolha das amostras é importante, antes de mais, ter em conta qual ou quais as amostras que vão ser recolhidas e quais os parâmetros a analisar antes mesmo de se iniciar o procedimento, a fim de que todo o material necessário seja preparado em concordância (especialmente número e tipo de recipientes de recolha, material para transporte das amostras, equipamento de proteção e prevenção adequado, material de identificação das amostras e documentos de registo para o laboratório e cliente). Após esta preparação, segue-se a deslocação ao local onde se dará início ao procedimento de recolha.

O primeiro passo do procedimento em si consiste na preparação dos técnicos, isto é, a colocação do equipamento de proteção (bata, touca e proteção de calçado, colocados de modo a garantir que qualquer peça de bijuteria esteja protegida, para que não interfira na operação) e a desinfeção das mãos. Segue-se a fase de recolha propriamente dita, durante em qual se tem de assegurar que todo o material que toca na amostra (como os recipientes de recolha, por exemplo) é estéril e que a amostra recolhida é representativa do produto que se pretende analisar. Depois da recolha, identifica-se cada amostra recolhida e regista-se no documento próprio para o efeito. No fim, garante-se que as amostras ficam bem acondicionadas e no recipiente certo para o transporte (que deverá ter acumuladores de gelo) antes de retirar todo o equipamento protetor. É fundamental garantir que, durante o transporte, as amostras estarão protegidas de contaminação externa pelo ar, por outras amostras e pelos recipientes de recolha e transporte, entre outros elementos do ambiente.

Cada tipo de amostra requer um modo de recolha específico, de modo a garantir o seu carácter representativo. Isto é perceptível ao analisar o modo de recolha de todos os tipos de amostra recolhidos durante o estágio, como se descreve de seguida:

- Esfregaços a mãos: através da utilização de uma zaragatoa estéril, faz-se um esfregaço em ziguezague ao longo da palma e dos dedos e depois nos espaços entre os dedos;

- Esfregações a superfícies: para superfícies planas (como bancadas, mesas, etc.), com uma zaragatoa estéril, faz-se esfregação em ziguezague numa área de cerca de 10x10 cm, primeiro numa direção e, em seguida, na direção perpendicular; para outros objetos (como utensílios, loiças, etc.), faz-se esfregação em zonas de declive ou frisos e, se possível, em ziguezague numa área plana dos mesmos;
- Esfregações a ralos: com uma zaragatoa estéril, faz-se um esfregação na parte inferior da rede e, depois, em ziguezague no fundo e/ou nas paredes do ralo;
- Alimentos prontos-a-comer: recolhe-se com um utensílio estéril ou outro devidamente higienizado, normalmente usado pelo cliente para manusear o alimento, para um saco *ziplock* estéril, mantendo-o aberto o mínimo de tempo possível;
- Águas de consumo: abre-se a torneira da água, deixando-se correr durante alguns segundos, após os quais se recolhe a água para uma garrafa estéril apropriada, mantendo-a aberta o mínimo de tempo possível.

3.3. Os meios de cultura

Os meios de cultura são meios artificiais que permitem o crescimento e o isolamento de bactérias e outros microrganismos⁸. Estes podem-se classificar, de acordo com as suas características físicas, em meios sólidos e semissólidos (meios que possuem um agente solidificante, como o agar-agar) ou meios líquidos⁹. Os meios podem ainda dividir-se em mais categorias, classificando-se, fundamentalmente, como meios de crescimento (desenvolvidos com o objetivo de fazer crescer a maioria dos microrganismos heterotróficos), meios de transporte (servem para preservar microrganismos), meios de enriquecimento (meios aos quais se adicionaram alguns elementos, para aumentar a quantidade do microrganismo desejado), meios seletivos (usados com o objetivo de isolar uma espécie ou género particular) e meios diferenciais (meios onde é possível distinguir umas colónias de outras por apresentarem uma característica distintiva)⁸⁻¹⁰. Na sua composição deverão constar alguns elementos básicos, como água, fonte de carbono, fonte de nitrogénio, sais minerais (como fosfatos, sulfatos, magnésio ou cálcio), fonte de energia e fatores de crescimento. Adicionalmente, nos meios seletivos devem estar presentes alguns inibidores, como antibióticos, antissépticos, sais de sódio, corantes ou outras substâncias químicas⁸. Há também diferenças no modo como os meios de cultura são obtidos, podendo apresentar-se prontos a usar (em recipientes como placas de Petri ou tubos), parcialmente completos (meios que requerem algum passo adicional antes da sua utilização, como, por exemplo, casos em que é necessário derreter o meio

ou distribuí-lo por placas de Petri) e como fórmula desidratada (requer a preparação do meio numa área dedicada a esse propósito)⁹. A preparação deste último tipo de meios deverá fazer-se como é descrito de seguida:

1. Verificação nas instruções do fabricante da massa a medir para o volume de meio que se pretende preparar;
2. Medição da massa para um frasco *schott*, não estéril, contendo um agitador;
3. Adição de água destilada até completar o volume desejado;
4. Colocação na placa de agitação, até dissolução completa do pó;
5. Para meios sólidos, colocação do frasco em banho de água a ferver até que o meio fique translúcido. Para meios líquidos, segue-se para o passo seguinte;
6. Autoclavagem do meio, sempre que indicado pelo fabricante.

Nos casos em que a inoculação de amostras é feita por incorporação do meio de cultura, a temperatura deste, no momento da distribuição pelas placas, deverá situar-se entre os 45 e os 48°C, aguardando-se em seguida pelo seu arrefecimento/solidificação com as placas dispostas numa superfície plana antes da respetiva incubação. Caso a inoculação seja feita por espalhamento, estrias ou outra abordagem que requeira o meio sólido, este deve ser primeiramente distribuído pelas placas e deve aguardar-se que solidifique completamente numa superfície plana antes da inoculação, sendo que, caso não seja imediatamente utilizado, deverá guardar-se no frigorífico a temperatura (5±3)°C.

Para além dos meios de cultura, são também usados com frequência diluentes como suporte aos ensaios microbiológicos. Estes consistem em soluções de carácter estéril cuja função é promover a recuperação de microrganismos ou a remoção de microrganismos de uma superfície⁹.

Durante o estágio, foram manuseados meios obtidos das 3 formas. Entre os meios prontos a usar, destacam-se os seguintes:

- RVS (*Rappaport-Vassiliadis Salmonella Broth*): meio líquido seletivo, usado para o enriquecimento de *Salmonella* spp., depois do pré-enriquecimento em meio adequado
- MKTTn (*Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth*): meio líquido seletivo, com a mesma função do anterior;
- CHROMagar™ *Salmonella Plus*: meio sólido seletivo e diferencial para o isolamento de *Salmonella* spp.;

- XLD (*Xylose Lysine Deoxycholate*): meio sólido seletivo e diferencial para isolamento de *Salmonella* e *Shigella* spp.;
- *Half-Fraser*: meio líquido seletivo de pré-enriquecimento para o isolamento de *Listeria* spp.;
- *Fraser*: meio líquido seletivo de enriquecimento para o isolamento de *Listeria* spp.;
- OCLA (*Oxoid Chromogenic Listeria Agar*) e ALOA (*Agar Listeria Ottaviani and Agosti*): meios sólidos seletivos e diferenciais homólogos usados no isolamento de *Listeria* spp.;
- PALCAM (*Polymyxin Acriflavin Lithium-chloride Cefotaxime Esculin Mannitol Agar*): meio sólido seletivo e diferencial para o isolamento de *Listeria* spp.;
- Columbia (Columbia Blood Agar): meio sólido não seletivo utilizado na cultura de vários microrganismos com o propósito de testar a sua atividade hemolítica;
- CCA (*Chromogenic Coliforms Agar*): meio sólido seletivo e diferencial para a detecção e enumeração de *Escherichia coli* e de outras bactérias coliformes em águas. Este meio também é frequentemente preparado no laboratório a partir da fórmula desidratada;
- S&B (*Slanetz & Bartley Agar*): meio sólido seletivo e diferencial para a enumeração de *Enterococcus* em águas. Como o anterior, este meio também pode ser preparado no laboratório a partir da fórmula desidratada;
- BEAA (*Bile Esculin Azide Agar*): meio sólido seletivo e diferencial para o isolamento e enumeração de *Enterococcus* spp. Este meio é usado para confirmar a presença de *Enterococcus* spp. que cresceram em S&B provenientes de uma dada amostra de água;
- TSC (*Tryptose Sulfite Cycloserine Agar*): meio sólido seletivo para o isolamento e enumeração de células vegetativas e esporos de *Clostridium perfringens*. É usado sobretudo em amostras de águas;
- MSA (*Mannitol Salt Agar*): meio sólido seletivo e diferencial para o isolamento e enumeração de espécies de *Staphylococcus*, sobretudo usado para identificar e enumerar *Staphylococcus aureus* em águas de piscina;
- PS:CN (*Pseudomonas + Ceftriaxone & Nalidixic Acid Agar*): meio sólido seletivo usado para o isolamento e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* em águas de piscina e engarrafadas;

Apenas um dos meios utilizados era parcialmente completo, sendo o seguinte:

- BP-RPF (*Baird Parker + Rabbit Plasma Fibrinogen Agar*): meio seletivo e diferencial para enumeração direta de colónias (sem necessidade de confirmação) de *Staphylococcus* coagulase-positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). Este meio é preparado usando um kit para o efeito: derrete-se a base de agar BP em banho de água a ferver e, depois de arrefecer até uma temperatura abaixo de 50°C (entre 44 e 48°C), adiciona-se o suplemento RPF (que deverá estar estabilizado pelo menos a temperatura ambiente), distribuindo-se, por fim, em placas de Petri.

Quanto aos meios preparados no laboratório exclusivamente a partir da respetiva fórmula desidratada, foram utilizados os seguintes:

- PCA (*Plate Count Agar*): meio sólido não seletivo utilizado para a enumeração dos microrganismos totais em amostras de alimentos, águas e esfregaços;
- MPCA (*Milk Plate Count Agar*): meio sólido não seletivo utilizado para a enumeração dos microrganismos totais em amostras de lacticínios;
- VRBG (*Violet Red Bile Glucose Agar*): meio sólido seletivo e diferencial usado na deteção e enumeração de bactérias da família *Enterobacteriaceae*;
- VRBL (*Violet Red Bile Lactose Agar*): meio sólido seletivo e diferencial usado na deteção e enumeração de bactérias coliformes;
- TBX (*Tryptone Bile X-Glucoronide Agar*): meio sólido seletivo e diferencial usado na deteção e enumeração direta (sem necessidade de confirmação das colónias características) de *Escherichia coli*;
- RB (*Rose Bengal Chloramphenicol Agar*): meio sólido seletivo utilizado na enumeração dos bolores e leveduras;
- Yeast (*Yeast Extract Agar*): meio sólido não seletivo usado na enumeração dos microrganismos totais em águas

Para além dos meios de cultura referidos, foram também utilizados alguns diluentes, entre eles:

- Citrato (*Tri-Sodium Citrate Dehydrate*): diluente utilizado para preparar as suspensões iniciais e diluições de amostras de leite e derivados;
- PWT (*Buffered Peptone Water*): diluente geral para preparação das suspensões iniciais e diluições de amostras de alimentos. Também é usado como meio de pré-enriquecimento para o isolamento de *Salmonella* spp;

- MR (*Maximum Recovery Diluent*): diluente isotônico e protetor utilizado na recuperação de microrganismos de diversas fontes. É usado com maior frequência na recuperação de microrganismos em zaragatoas utilizadas nos esfregaços de superfícies.

3.4. Suspensão inicial e diluições decimais das amostras

A análise microbiológica de géneros alimentícios apenas pode ser efetuada após a preparação ou processamento da amostra inicial, que se faz para garantir que, na fração a analisar, os microrganismos estão distribuídos o mais uniformemente possível. Esta preparação consiste em fazer uma suspensão inicial da amostra, de acordo com o que está descrito na norma ISO 6887-1:2017¹¹. Na prática, mede-se uma massa ou volume adequado da amostra (especificados nas normas ISO de cada parâmetro a analisar, sendo o mínimo 10 g ou 10 mL, salvo indicação contrária) para um saco estéril próprio para *Stomacher*, adiciona-se o diluente em quantidade igual a 9 vezes a massa (em gramas) ou 9 vezes o volume (em mililitros) e, por fim, efetua-se a homogeneização da mistura. Esta suspensão inicial é comumente denominada diluição 10^{-1} .

Em muitos casos, a inoculação da diluição 10^{-1} dá origem a placas com crescimento incontável de colónias de microrganismos, pelo que se torna necessário preparar mais diluições da suspensão inicial. Por norma, preparam-se diluições decimais (também chamadas de diluições 10^{-2} , 10^{-3} , etc.), que se efetuam através da adição de 1 mL da suspensão inicial ou da diluição anterior à desejada a 9 mL do diluente utilizado e subsequente homogeneização.

Note-se que o tempo decorrido desde a preparação da suspensão inicial até à inoculação da mesma não deverá exceder 45 minutos e desde a preparação de uma suspensão até à diluição decimal seguinte não devem decorrer mais de 30 minutos.

3.5. Cálculo e expressão de resultados

Várias das análises efetuadas consistem na enumeração de um dado tipo de microrganismo, resultado que se costuma expressar em número de UFC desse microrganismo por mililitro ou grama de amostra. Para chegar a estas unidades é sempre necessário fazer um cálculo a partir do número de colónias observadas nas placas de Petri

em causa, cálculo esse que vem descrito na norma ISO 7218:2007⁷. Na generalidade dos casos, o cálculo corresponde à resolução da equação (1), representada a seguir.

$$N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d} \quad (1)$$

Legenda:

N – número de UFC do microrganismo presentes, por mililitro ou grama, na amostra, como resultado da média de duas diluições sucessivas;

$\sum C$ – somatório das colónias das placas correspondentes a duas diluições sucessivas em que pelo menos uma contém, no mínimo, 10 colónias;

V – volume do inóculo, em mL, incorporado em cada placa;

d – fator de diluição correspondente à primeira diluição utilizada.

Esta expressão pode ser aplicada com grande precisão para placas que contenham 10 ou mais colónias. Para placas com menos de 10, mas com um mínimo de 4 colónias, poderá também aplicar-se, mas dado o grau de precisão inferior, deve indicar-se no relatório de resultados que a contagem é aproximada. Para placas com um número de colónias entre 3 e 1, a expressão não se aplica, devendo reportar-se que há presença de microrganismos em quantidade inferior a $(4/Vd)$ por mililitro ou por grama. Na ausência de crescimento microbiano nas placas, indica-se no resultado que a quantidade de microrganismos presente é inferior a $(1/Vd)$ por mililitro ou por grama.

Para esfregaços, recolhidos com zaragatoas estéreis, as unidades não são as mesmas, costumando o resultado expressar-se em número de UFC por cm^2 ou por área analisada (quando a superfície não é mensurável). Assim, o cálculo efetua-se de outra maneira, isto é, usa-se a expressão (2), conforme indicado na norma ISO 18593:2018¹².

$$N_s = \frac{N \times F}{A} \times D \quad (2)$$

Legenda:

N_s – número de UFC do microrganismo presentes por cm^2 ou por área analisada;

N – número de colónias enumeradas na placa (n° de UFC em 1 mL de diluente);

F – quantidade de diluente no tubo, em mililitros;

A – área em que recolheu a amostra, em cm^2 ;

D – recíproco da diluição utilizada.

Em águas de consumo, a parte inicial de todos os ensaios consiste na filtração de 100 mL da amostra e posterior inoculação da membrana usada, pelo que, para se ter o resultado efetivo, não é necessário fazer cálculos. Nestes casos, para obter o resultado final são contadas as colónias típicas do ou dos microrganismos a analisar e regista-se esse valor, expresso em número de UFC por 100 mL.

3.6. Os parâmetros analisados

3.6.1. Enumeração de microrganismos a 30°C

A enumeração de microrganismos a 30°C é um método horizontal que se pode aplicar a vários tipos de amostras, como produtos para consumo humano ou animal e amostras ambientais na área da alimentação. Através deste método é possível enumerar todos os microrganismos que têm capacidade de crescimento e formação de colónias em condições de aerobiose em meio sólido a 30°C, considerando-se, assim, uma contagem dos microrganismos viáveis. Algumas limitações do método incluem o facto de não diferenciar os vários tipos de microrganismos presentes, não permitir a deteção de células que não crescem em placas (como bactérias que formam esporos ou se encontram em estado viável mas não cultivável, isto é cujo metabolismo funciona mas com nível de atividade muito baixo, não se conseguindo dividir) e não permitir a deteção de bactérias anaeróbias¹³. É essencial notar que uma contagem baixa não implica que não existam microrganismos patogénicos na amostra em causa, que poderão causar algum tipo de infeção mesmo em baixa concentração, pelo que este parâmetro tem maior importância na avaliação da qualidade do produto e eficácia do processamento e controlo higiénico do que na determinação do seu grau de segurança e risco para a saúde¹³.

A técnica efetuada para analisar este parâmetro está descrita na norma ISO 4833-1:2013¹⁴ e consiste na preparação da suspensão inicial com PWT, como descrito na secção 3.4. (no caso de leite e derivados, usa-se citrato como diluente e para zaragatoas de esfregaços usa-se MR), preparação de diluições sucessivas conforme necessário e inoculação por incorporação de PCA (ou, para amostras de leite e derivados, MPCA) de 1 mL das diluições a avaliar. Finalmente, as placas devem incubar na estufa a (30±1)°C e, ao fim de 72±3 horas, faz-se a leitura das cujo número de UFC totais visíveis esteja entre 15 e 300. Na **Figura 1** observam-se dois exemplos de placas obtidas: uma com mais de 300 colónias e uma com um número de colónias entre 15 e 300 – contagem de 63.

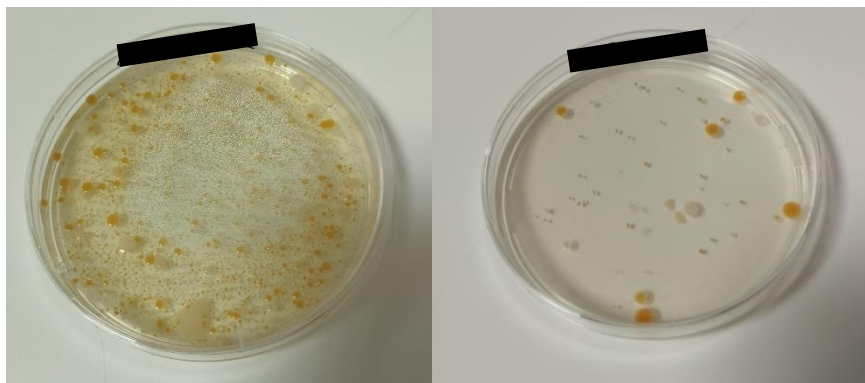


Figura 1. Placas de meio não seletivo, onde se verificou crescimento microbiano. À esquerda, uma placa com mais de 300 colónias, à direita uma placa com 63 colónias.

3.6.2. Enumeração de microrganismos a 22°C ou 37°C

A enumeração de microrganismos a 22°C ou 37°C é um ensaio bastante semelhante ao descrito anteriormente, embora tenha aplicações diferentes, ao enquadrar-se no âmbito dos ensaios em águas em vez de alimentos e permitindo enumerar todos os microrganismos que conseguem crescer em aerobiose a 22°C (para águas de consumo) ou 37°C (para águas de piscina) num meio sólido. É de ter em conta que o resultado desta análise não é uma medida da segurança da água em causa para a saúde humana, devendo sim ser considerado um parâmetro avaliador da integridade da fonte da água, da eficiência do seu tratamento e da medida da limpeza e estabilidade do seu sistema de distribuição¹⁵. Para mais, o estado de alerta em relação ao resultado deverá surgir nos casos em que há uma alteração inesperada relativamente ao que é expectável, com base numa monitorização frequente e de longa duração¹⁵.

A norma base deste método é a ISO 6222:1999¹⁵, segundo a qual se deverá inocular numa placa, por incorporação, 1 mL da água em causa em meio *Yeast*. Depois de se aguardar a sua solidificação numa superfície plana, incuba-se, consoante o tipo de água, a (22±2)°C ou (36±2)°C (na estufa de (37±1)°C) por 68±4 horas e contam-se todas as colónias que cresceram, caso o seu número seja menor ou igual a 300.

3.6.3. Enumeração de *Enterobacteriaceae*

As *Enterobacteriaceae* são uma família heterogénea de bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas, em forma de bastonete e não formadoras de esporos¹⁶. Esta inclui as espécies dos géneros *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* e *Yersinia*. As bactérias pertencentes a esta família têm uma distribuição muito ampla e o seu habitat habitual é o trato intestinal dos animais, sendo que existem espécies comensais inócuas ou benéficas, com um papel significativo na manutenção do ambiente anaeróbico do intestino, produção de

vitaminas e proteção contra agentes patogênicos, e outras que são importantes patógenos, tendo-se já verificado a sua associação à progressão de doenças associadas à obesidade, doença de Crohn e outras doenças inflamatórias intestinais¹⁶⁻¹⁸. No âmbito das análises alimentares e ambientais, a detecção e enumeração de *Enterobacteriaceae* é um parâmetro muito utilizado para avaliação do estado de higiene e possíveis falhas do processo de fabrico¹⁶.

No âmbito dos alimentos, o laboratório baseia-se no ensaio descrito na norma NF Vo8-054, o que se resume à preparação da suspensão inicial e respetivas diluições usando o diluente apropriado, inoculação de 1 mL das diluições a analisar por incorporação de meio VRBG e incubação na estufa a $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ ou $(37\pm 1)^\circ\text{C}$, conforme o tipo de amostra (por exemplo, para alimentos a temperatura ideal é 37°C ao passo que para esfregaços de superfícies é 30°C). Depois de 24 ± 2 horas de incubação pode contar-se o número de colónias características, que, neste caso, são de coloração roxo-escuro/rosa avermelhada, com ou sem halo.

3.6.4. Enumeração de coliformes

Os coliformes são um grupo que inclui quatro espécies de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii*, sendo bacilos Gram-negativos e não formadores de esporos que, a uma temperatura ótima entre 35 e 37°C , fermentam rapidamente a lactose, produzindo ácido e gás^{19,20}. Entre estas espécies, destacam-se os coliformes fecais (em que a bactéria predominante é a *E. coli*), que possuem uma associação mais direta com a contaminação fecal por vertebrados de sangue quente¹⁹. Este tipo de bactérias, que poderão ser comensais ou patogênicas, é utilizado como indicador da qualidade sanitária de alimentos e águas.

A norma em que se baseia este ensaio para alimentos é a ISO 4832:2006²¹, segundo a qual, após a preparação da suspensão inicial e diluições necessárias como descrito anteriormente, se inocula, por incorporação de meio VRBL, 1 mL das mesmas em placas de Petri estéreis. Depois da solidificação por completo do meio, deve-se adicionar mais cerca de 4 mL sobre o mesmo e incubar as placas correspondentes às amostras, assim como uma placa controlo contendo apenas meio (cuja função é verificar a sua esterilidade) a $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Para a enumeração, seleciona-se, sempre que possível, as placas com um número de colónias entre 10 e 150 e contam-se as colónias roxo-avermelhadas com diâmetro de, pelo menos, 0,5 mm (estas são típicas e não necessitam de posterior confirmação). Deve-se ainda contar e confirmar as colónias atípicas e todas as colónias correspondentes a amostras de produtos lácteos que

contenham outros açúcares para além da lactose. Esta confirmação é feita através da inoculação de 5 colónias atípicas de cada tipo (sempre que disponíveis) em tubos de *Brilliant Green Lactose Bile* e incubação a 30 ou 37°C por 24±2 horas. Nos tubos em que se detetar a presença de gás considera-se um resultado positivo para coliformes.

Os coliformes são analisados em águas segundo as indicações da ISO 9301-1:2014²²: filtra-se a vácuo 100 mL de água através de uma membrana com 0,45 µm de diâmetro de poro, transfere-se a membrana para uma placa contendo o meio CCA (com cuidado para não incluir bolhas de ar entre a membrana e o meio) e incuba-se a (36±2)°C durante 21 a 24 horas. As colónias de cor azul correspondem a *Escherichia coli* e não carecem de mais confirmação, contribuindo para o número total de coliformes. As colónias rosa (aspeto típico apresentado na **Figura 2**) são provavelmente coliformes, mas deverá fazer-se um passo adicional de confirmação, que consiste na passagem através de uma ansa estéril das colónias para um meio não seletivo (usa-se meio PCA), incubação a (37±1)°C durante 24 horas e teste da presença da enzima oxidase, usando fitas comerciais apropriadas para o efeito. As colónias confirmadas são oxidase-negativas.



Figura 2. Placa de CCA com colónias típicas de bactérias coliformes.

3.6.5. Enumeração de *Escherichia coli* β-glucoronidase positiva

A *Escherichia coli* é uma bactéria coliforme pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, sendo por isso considerado um bacilo Gram-negativo, apesar de por vezes se poder apresentar como cocos²³. Esta bactéria é comensal no trato gastrointestinal dos animais, embora apresente algumas estirpes infecciosas, que representam perigo para a saúde humana e animal²³. Em análises a alimentos este microrganismo é considerado um indicador de contaminação fecal e de má qualidade das práticas de higiene no processo de fabrico²⁴. Para as águas de consumo é um indicador de poluição, sendo um dos parâmetros usados para avaliar a sua potabilidade²⁵.

Cerca de 97% das estirpes de *E. coli* expressam a enzima β -D-glucoronidase, sendo uma característica que distingue esta de outras bactérias coliformes e por isso usada para detetar a sua presença nas amostras, recorrendo-se com frequência a meios que contenham compostos cromogénicos que produzem cor por ação desta enzima²⁶.

O método utilizado para deteção e quantificação desta bactéria em alimentos está descrito na norma ISO 16649-2:2001²⁷, em cujo procedimento é referido que deverá fazer-se a suspensão inicial e diluições decimais, inocular-se 1 mL de cada uma destas por incorporação do meio TBX e, após solidificação do meio, incubar-se durante 4 horas a $(37\pm 1)^\circ\text{C}$. Depois do tempo estipulado, procede-se a uma nova incubação por mais 18 a 24 horas a $(44\pm 0,5)^\circ\text{C}$. Para a enumeração de *E. coli* deverão ser contabilizadas as colónias de cor azul (um exemplo de colónias típicas encontra-se retratado na **Figura 3**) sempre que o seu número for inferior a 150 e o número total de colónias (típicas e atípicas) for menor que 300.



Figura 3. Placa de TBX onde se observa o crescimento de mais de 150 colónias típicas de *E. coli*.

Nas águas de consumo, o método utilizado é o que está descrito na subsecção anterior (3.6.4), não sendo necessário os passos de confirmação. Para o resultado, apenas é necessário contar as colónias azuis, cujo aspeto típico é possível observar na **Figura 4**.



Figura 4. Placa de CCA com colónias típicas de *Escherichia coli*.

3.6.6. Detecção e enumeração de *Enterococcus* spp.

Enterococcus é um género de bactérias Gram-positivas produtoras de ácido láctico, que habitam o intestino de todos os animais e são resistentes a uma grande variedade de condições adversas do ambiente, como flutuações de pH, aumentos de temperatura e altas concentrações de cloreto de sódio, sendo capazes de sobreviver durante mais tempo no ambiente, quando comparadas com outras espécies de bactérias intestinais²⁸. Normalmente apresentam-se sob a forma de cocos e surgem aos pares ou em cadeia em meio líquido²⁹. Este tipo de bactérias, que proliferam na microflora normal do trato gastrointestinal, não tem um elevado grau de patogenicidade, podendo no entanto causar infeções oportunistas em indivíduos mais sensíveis (crianças, indivíduos hospitalizados ou imunocomprometidos e idosos, por exemplo), tendo sido já associado a complicações como bacteremia, peritonite, endocardite e infeção do trato urinário^{28,29}. Devido à sua presença em quantidade elevada nas fezes, a quantificação de *Enterococcus* spp. serve como indicador da presença e grau de contaminação fecal em águas²⁸.

A norma ISO 7899-2:2000³⁰ descreve-nos o procedimento para realizar esta técnica de análise em águas, em que se começa por filtrar a vácuo de 100 mL da água através de uma membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm, transfere-se a membrana para uma placa de S&B e incuba-se a placa a (36±2)°C (usa-se a estufa a (37±1)°C) durante 44±4 horas. Decorrido este tempo, contam-se as colónias de cor vermelha a rosa escuro (um exemplo de colónias típicas obtidas encontra-se representado na **Figura 5**) e faz-se o teste de confirmação, que consiste na passagem da membrana para uma placa de BEAA pré-aquecida a 44°C e incubação durante em máximo de 2 horas a (44,5±0,5)°C. As colónias confirmadas deverão ser de cor preta no fim desse tempo, devido à capacidade de hidrólise da esculina presente no meio por este tipo de bactérias, cujo produto final reage com iões de ferro (III), produzindo essa cor característica.

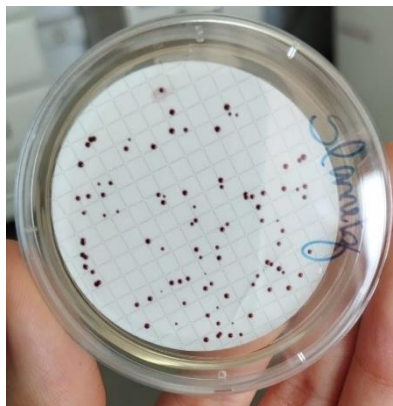


Figura 5. Placa de S&B com colónias típicas de *Enterococcus* spp.

3.6.7. Enumeração de *Staphylococcus* spp.

As bactérias do género *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, sem capacidade de locomoção e geralmente catalase-positivos³¹. Entre as bactérias deste género diferenciam-se dois grupos: as coagulase-positivas (no geral, são consideradas patogénicas, apesar de poderem também colonizar indivíduos saudáveis sem causar sintomas) e as coagulase-negativas (fazem parte da flora saprófita, gerando possíveis infeções do tipo oportunista)³¹. Das bactérias do género *Staphylococcus* coagulase-positivas, destaca-se a *Staphylococcus aureus*, que é um dos patógenos mais perigosos para a saúde humana. Esta espécie está amplamente disseminada pelo mundo e a sua distribuição pelas várias regiões geográficas acontece, com regularidade, através de alimentos e produtos derivados do leite, cuja contaminação microbiana é facilitada pela falta de procedimentos eficazes de higienização durante o seu processamento e manuseamento³². Alguns dos fatores que contribuem para a elevada patogenicidade deste microrganismo são a sua evasão e adesão no interior no hospedeiro e a resistência às respostas imunológicas³². A deteção deste tipo de bactérias é importante no controlo microbiano de alimentos, especialmente nos derivados do leite e todos os cuja produção é feita à mão, já que pode estar presente na cavidade nasal e na pele.

Nos alimentos e amostras ambientais na área alimentar, faz-se a enumeração de *Staphylococcus* coagulase-positiva, seguindo-se as diretrizes da norma ISO 6888-2:2021³³, o que consiste na preparação da suspensão inicial e respetivas diluições, inoculação de 0,1 mL das mesmas por espalhamento com uma ansa em L sobre o meio BP-RPF e, após 15 minutos de espera à temperatura ambiente, incubação entre 35 e 38°C (no laboratório, a temperatura utilizada é (37±1)°C) durante 24±2 horas, incubando, se necessário, por mais 24±2 horas. No fim contam-se as colónias típicas, que podem ser de cor preta, cinzenta ou branca com a presença de um halo de precipitação, indicador

da atividade da coagulase, nas placas que contenham um máximo de 300 colónias com 100 colónias típicas. Um exemplo deste tipo de colónias está representado na **Figura 6**.

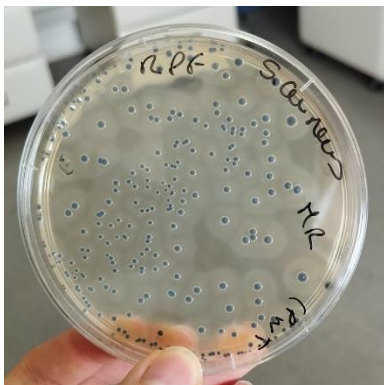


Figura 6. Placa de BP-RPF com colónias típicas de *Staphylococcus* coagulase-positiva, neste caso *S. aureus*.

Nas amostras de água também é possível determinar a presença e enumerar colónias de *Staphylococcus* spp. Para isso, usa-se o procedimento descrito na norma NP 4343:1998³⁴, em que o primeiro passo, como nas restantes análises a águas, é a filtração a vácuo de 100 mL da água através de uma membrana de poro 0,45 µm. Seguidamente transfere-se a membrana para uma placa de meio MSA e incuba-se a $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 4 horas. As colónias típicas de *Staphylococcus* spp. neste meio são amarelas ou brancas, com ou sem halo amarelo (veja-se um exemplo do seu aspeto típico na **Figura 7**), no entanto, se se verificar o seu crescimento, ainda é necessário fazer a confirmação. Para tal, agrupam-se as colónias suspeitas pelo seu aspeto, isolam-se três colónias de cada tipo em meio não seletivo de isolamento (Nutrient Agar), incuba-se a $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 4 horas e faz-se a coloração de Gram. Caso não se visualizem cocos Gram-positivos, não se prossegue com o ensaio. Em caso positivo, efetuam-se os testes de confirmação: são estes o teste da catalase (colocação de uma gota de peróxido de hidrogénio numa lâmina e adição de uma colónia, com resultado positivo se se formarem bolhas de oxigénio), o teste da coagulase (transferência das colónias para tubos contendo plasma de coelho, incubação a $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ e verificação às 4 e às 24 horas se há a presença de coágulo, caso no qual o resultado é positivo) e o teste da determinação do tipo respiratório (regeneração de meio semissólido de carne e levedura – meio de Hugh Leifson - e respetiva manutenção a $(45\pm 1)^{\circ}\text{C}$, inoculação de uma colónia isolada em toda a altura do meio, de baixo para cima, solidificação imediata do meio por colocação dos tubos em água fria, incubação a $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 4 horas e observação final do crescimento, sendo o resultado positivo se se verificar crescimento em todo o meio). Deve-se registar os resultados do número de *Staphylococcus* produtores de coagulase e *Staphylococcus* não produtores de coagulase, por 100 mL.

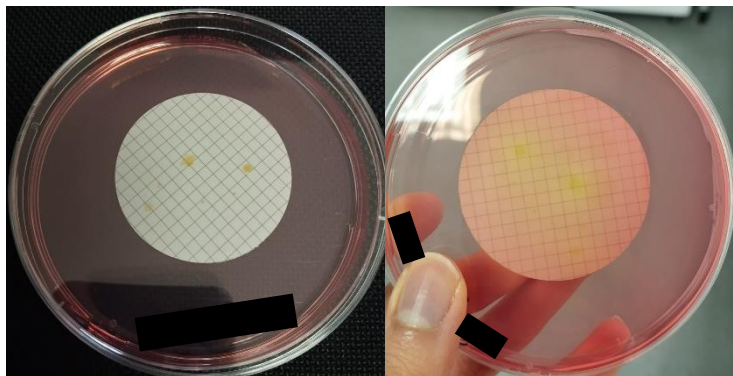


Figura 7. Placa de MSA com 3 colônias típicas de *Staphylococcus* spp., observadas sobre e sob a membrana, respetivamente à esquerda e à direita.

3.6.8. Detecção de *Salmonella* spp.

As bactérias do género *Salmonella* fazem parte da família das *Enterobacteriaceae*, sendo bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos e que se movem através do uso de flagelos^{35,36}. Este tipo de bactérias é um dos mais frequentemente associados a surtos de infeções originadas por alimentos, causando salmonelose, uma infeção do trato gastrointestinal cujo quadro clínico se manifesta como uma gastroenterite por vezes associada a dor de cabeça, febre e mialgia³⁶. A salmonelose está principalmente ligada ao consumo de alimentos contaminados por *Salmonella* spp., na sua maioria produtos à base de ovos, carne de aves e carne de porco, sendo as vias de contaminação mais comuns a má higienização das mãos, manuseamento errado dos produtos (por exemplo, ao não se separar carne crua de alimentos cozinhados, cozinhar-se a temperatura incorreta ou não se armazenar os alimentos no frio antes e depois da sua preparação) e contacto com fezes de animais infetados³⁶.

No laboratório, a deteção qualitativa de *Salmonella* spp. faz-se recorrendo-se às indicações da norma ISO 6579-1:2017³⁷, segundo as quais a análise é faseada em quatro etapas sucessivas: pré-enriquecimento em meio não seletivo líquido, enriquecimento em meio seletivo líquido, inoculação em meio seletivo sólido e confirmação. Na primeira fase prepara-se uma suspensão da amostra utilizando o meio PWT e incuba-se durante 18±2 horas entre 35 e 38°C (neste caso, a incubação é a (37±1)°C). Para o enriquecimento, transfere-se 1 mL da amostra pré enriquecida para um tubo com meio MKTTn e 0,1 mL da mesma amostra para um tubo contendo meio RVS, incubando-se seguidamente a (37±1)°C (para o MKTTn) ou a (41,5±1)°C (para o RVS) durante 24±3 horas. A segunda fase corresponde à inoculação com uma ansa estéril das amostras enriquecidas em duas placas: uma de XLD e outra de *CHROMagar™ Salmonella Plus*, incubando-se ambas a (37±1)°C por 24±3 horas. Seguidamente seleciona-se, pelo menos, uma colónia típica (no XLD são pretas com uma zona translúcida ligeiramente vermelha em redor e no

CHROMagar™ Salmonella Plus são malva – observe-se o seu aspeto típico na **Figura 8**), que se passa para o meio PCA e se incuba por mais 24 ± 3 horas a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. A confirmação é efetuada com testes bioquímicos (através de testes API – Analytical Profile Index, usando-se mais especificamente o teste API 32E, representado na **Figura 9**) e testes serológicos (testes da presença dos antígenos O e H de *Salmonella* e, opcionalmente, de antígenos Vi). Se o resultado for negativo, pode fazer-se a seleção de até mais quatro colónias suspeitas para confirmação.

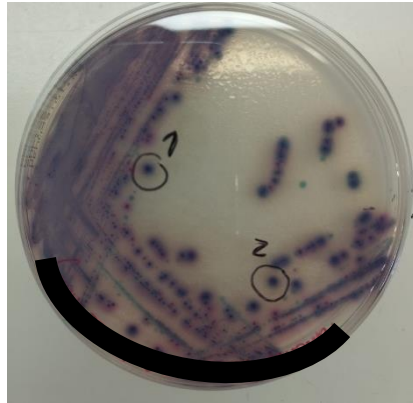


Figura 8. Placa de *CHROMagar™ Salmonella Plus* com colónias típicas de *Salmonella* spp. Estão assinaladas com 1 e 2 duas colónias isoladas.



Figura 9. Teste API 32E: conjunto de poços com testes bioquímicos usados para confirmação de *Salmonella* spp.

3.6.9. Detecção de *Listeria monocytogenes* e outras *Listeria spp.*

Listeria é um género de pequenos bacilos Gram-positivos, não formadores de esporos e com locomoção que tem uma dimensão muito ampla, estando até ao momento descritas 28 espécies diferentes³⁸. Estas bactérias são ubíquas no ambiente e podem contaminar alimentos prontos-a-comer, vegetais, carne, ovos, leite e derivados, peixe e marisco, estando por isso inequivocamente associadas a infeções transmitidas por alimentos³⁹. Entre as diferentes espécies, a mais preocupante em termos de perigo para a saúde pública é a *Listeria monocytogenes*, embora a *Listeria ivanovii* constitua um patógeno relevante em animais³⁹. A primeira é caracterizada como um microrganismo anaeróbio facultativo, com capacidade de locomoção a temperatura entre 22 e 28°C mas não se conseguindo movimentar partir de 30°C, capaz de se desenvolver entre -0,4°C e 45°C (com temperatura ótima de crescimento de 37°C), capaz de sobreviver em ambiente com baixa a_w e num abrangente intervalo de pH (4,6-9,5)⁴⁰. A infeção transmitida por esta bactéria denomina-se listeriose e possui uma elevada taxa de mortalidade (entre 20 e 30%), sendo especialmente perigosa em crianças, grávidas, idosos e indivíduos imunocomprometidos⁴⁰. As características inerentes a este microrganismo contribuem para a sua capacidade de persistência em vários locais, como locais de produção de alimentos, tendo-se descoberto a sua persistência no ambiente durante 8 semanas, facto que é agravado por más práticas de higiene e limpeza ineficaz⁴⁰.

A análise deste tipo de bactérias é efetuada com base na norma ISO 11290-1:2017⁴¹, sendo também dividida em quatro fases sucessivas. A primeira fase consiste no enriquecimento primário em meio líquido seletivo com concentração reduzida dos agentes seletivos (meio *Half-Fraser*), ou seja, faz-se a suspensão inicial usando 25 g ou 25 mL de amostra, como descrito em 3.4., usando o meio *Half-Fraser* e incuba-se por 25±1 horas a (30±1)°C. A segunda fase constitui o enriquecimento secundário em meio líquido seletivo com concentração completa dos agentes seletivos (meio *Fraser*) e efetua-se passando 0,1 mL da solução enriquecida para um tubo contendo meio *Fraser*, incubando-se, seguidamente, por 24±2 horas a (37±1)°C. Na terceira fase procede-se à inoculação da amostra enriquecida, usando uma ansa estéril, em placas de ALOA ou OCLA e de PALCAM, incubando-se ambas a (37±1)°C por 48±2 horas, embora se possam retirar da estufa passadas 24 horas se já forem evidentes colónias que se presumam ser de *L. monocytogenes* ou outras *Listeria spp.* A última fase é a confirmação, sendo obrigatória a realização de três testes em pelo menos uma e, se necessário, em até mais quatro colónias (as colónias típicas são azul-esverdeadas com um halo circundante em meio ALOA ou OCLA – representação na **Figura 10** – e são cinzentas a verdes com centro preto e halo em PALCAM). Estes compreendem o teste de β-hemólise em agar-

3.6.11. Detecção e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma espécie de bacilos Gram-negativos, com capacidade de locomoção e aeróbios facultativos que conseguem sobreviver a temperaturas entre 4 e 42°C e com temperatura ótima de crescimento de 37°C⁴⁵. O habitat natural destas bactérias é diversificado e inclui o solo e águas, sendo nestas últimas um dos indicadores mais adequados da presença de patógenos, para além de ser um dos contaminantes mais comuns na produção de água de consumo devido ao seu gene de resistência a desinfetantes⁴⁶. Em humanos é um patógeno oportunista, afetando muito raramente indivíduos saudáveis, no entanto é problemático durante as infeções uma vez que é resistente a várias classes de antibióticos e agentes terapêuticos⁴⁵.

A deteção e enumeração de *P. aeruginosa* faz-se, exclusivamente, em águas e segue as instruções explícitas na norma ISO 16266:2006⁴⁷. De acordo com esta norma, após se fazer a filtração da água através do filtro de poro 0,45 µm, transfere-se a membrana para uma placa de PS:CN e incuba-se a (36±2)°C por um total de 44±4 horas, fazendo-se a leitura dos resultados às 22±2 e 44±4 horas. Todas as colónias azuis-esverdeadas, com ou sem fluorescência, consideram-se positivas para *P. aeruginosa*, não necessitando de confirmação adicional (como exemplo de colónias típicas, observe-se a **Figura 11**). Quanto aos restantes tipos de colónias, as que não forem fluorescentes sob luz UV devem ser testadas para a reação da oxidase (colocação de 2 ou 3 gotas de reagente oxidase num papel de filtro, deposição das colónias pelo papel usando uma ansa estéril e registo de resultado positivo se se observar a formação de cor roxa-azulada em 10 segundos) e se forem oxidase-positivas devem ser testadas para a produção de fluoresceína (inoculação de uma placa de Nutrient Agar com as colónias a testar, incubação a (36±2)°C durante 22±2 horas, inoculação da cultura que cresceu em meio King's B, nova incubação a (36±2)°C durante um máximo de 5 dias com observação diária da produção de fluorescência e registo de resultado positivo caso a fluorescência seja detetada) e para a capacidade de produção de amónia a partir de acetamida (inoculação de uma placa de Nutrient Agar com as colónias a testar, incubação a (36±2)°C durante 22±2 horas, inoculação da cultura num tubo contendo Acetamide Broth, nova incubação a (36±2)°C durante 22±2 horas, adição de 1 ou 2 gotas de reagente de Nessler e registo de resultado positivo caso se verifique o desenvolvimento de cor amarela ou vermelha). Já nas colónias que apresentem fluorescência inicialmente, apenas é necessário fazer o teste de produção de amónia a partir de acetamida.

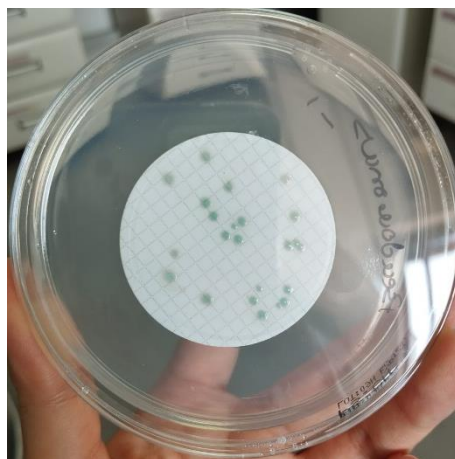


Figura 11. Placa de PS:CN com colónias típicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.6.12. Enumeração de *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens é uma espécie bacteriana Gram-positiva com metabolismo anaeróbico obrigatório, alguma capacidade de locomoção através do uso de fimbrias e que consegue formar esporos⁴⁸. Estes esporos são muito resistentes a condições adversas ambientais, tais como temperaturas elevadas, presença de oxigénio e baixo nível de nutrientes⁴⁹. Uma vez que as bactérias desta espécie têm grande capacidade de resistência, podem habitar em ambientes muito diversos, verificando-se a sua existência em solos, fezes, esgotos, alimentos e o trato intestinal de humanos e animais, sendo um importante patógeno de humanos e gado^{48,49}. O seu carácter tóxico deve-se sobretudo à capacidade de segregação de toxinas potentes, com métodos de atuação diversos e que causam várias doenças^{48,49}.

A enumeração de *C. perfringens* pode ser efetuada tanto em alimentos como em águas de consumo, no entanto, uma vez que no decorrer do estágio só foi feita esta análise em águas, o foco residirá no método para este tipo de amostras. Para analisar *C. perfringens* em águas é seguida a norma ISO 14189:2013⁵⁰: primeiramente faz-se a filtração a vácuo de 100 mL da amostra, usando uma membrana de poro 0,45 µm; depois, transfere-se a membrana usada para uma placa de meio TSC e incuba-se, em condições de anaerobiose, a (44±1)°C durante 21±3 horas. As colónias características que se desenvolverem passado esse tempo (colónias de cor preta ou cinzenta a amarelo acastanhado – devido à redução de sulfito a sulfureto, que reage com o sal férrico do meio) deverão ser submetidas a um teste de confirmação. Este teste consiste na passagem das colónias, com o auxílio de uma ansa, para meio Columbia, incubação em condições de anaerobiose a (36±2)°C durante 21±3 horas e teste da fosfatase ácida (passam-se as colónias, com uma ansa estéril, para papel de filtro, depositam-se 2 ou 3 gotas de reagente fosfatase ácida e

registra-se um resultado positivo se aparecer cor púrpura em 3 minutos, conforme é possível verificar na **Figura 12**).



Figura 12. Teste da fosfatase ácida com resultados positivos (setas verdes) e negativos (setas laranja)

3.7. Os produtos e análises mais frequentes

Os produtos analisados ao longo deste estágio apresentaram muita variabilidade, estendendo-se desde alimentos (sendo os mais comuns leites, queijos, enchidos, carnes cruas e refeições ou alimentos prontos-a-comer) a esfregaços (de superfícies diversas – sobretudo de contacto com alimentos - e mãos de manipuladores) e águas (de consumo e de piscinas).

Consoante cada tipo de produto há um conjunto de parâmetros mais frequentemente nele analisados: para leites, é habitual a enumeração dos microrganismos totais a 30°C e a deteção de *Listeria monocytogenes*; em queijos, enchidos e carnes cruas, as determinações mais comuns são a enumeração de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus* coagulase-positiva e a deteção de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*; os parâmetros mais analisados em alimentos prontos-a-comer são a enumeração dos microrganismos totais a 30°C, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase-positiva e a deteção de *Salmonella* spp.; nos esfregaços, se forem de superfícies de contacto com alimentos, efetua-se a enumeração dos microrganismos totais a 30°C e de *Enterobacteriaceae*, se forem de ralos, faz-se ainda a deteção de *Listeria monocytogenes* e se forem de manipuladores, o mais adequado é a deteção de *Staphylococcus* coagulase-positiva; já em águas, para determinar se estão aptas para consumo efetua-se a enumeração de bactérias coliformes, *Escherichia coli*, *Enterococcus*

spp., *Clostridium perfringens* e microrganismos totais a 22°C, ao passo que, em águas de piscina, as análises efetuadas com maior frequência são a enumeração de bactérias coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase-positiva e coagulase-negativa, *Pseudomonas aeruginosa* e microrganismos totais a 37°C.

3.8. Dados estatísticos das atividades desempenhadas

O trabalho laboratorial correspondente ao presente estágio curricular teve uma duração de cerca de 8 meses, tendo decorrido entre os dias 28 de setembro de 2023 e 10 de maio de 2024. Durante este tempo, foi feito um elevado número de ensaios analíticos numa grande quantidade de amostras. Foi analisado um total de 3497 amostras, entre as quais 2363 eram de alimentos (67%), 238 de águas (7%) e 896 de esfregaços de superfícies e manipuladores (26%), dados que se encontram resumidos no gráfico da **Figura 13**.

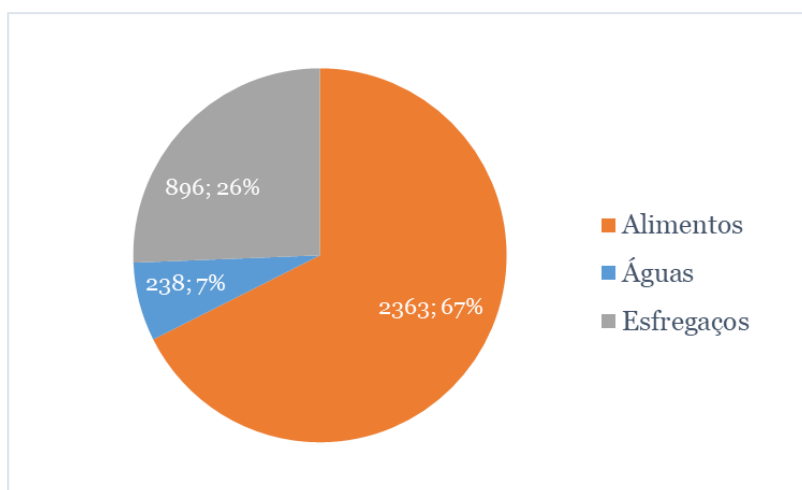


Figura 13. Representação gráfica da quantidade de amostras analisadas de cada tipo.

Nestas amostras foram determinados, ao todo, 5743 parâmetros (3481 em alimentos, 877 em águas e 1385 em esfregaços), com uma distribuição muito heterogénea. O parâmetro mais vezes analisado foi a quantidade de microrganismos totais, com um total de 2391 enumerações (1800 em alimentos, 124 em águas e 467 em esfregaços). Relativamente aos restantes parâmetros, efetuaram-se 545 enumerações de *Enterobacteriaceae* (99 em alimentos e 446 em esfregaços), 249 de bactérias coliformes (2 em alimentos e 247 em águas), 829 de *Escherichia coli* (535 em alimentos, 247 em águas e 47 em esfregaços), 150 de *Enterococcus* em águas, 591 de *Staphylococcus* spp. (237 de *Staphylococcus* coagulase-positiva em alimentos, 11 de *Staphylococcus* coagulase-positiva e coagulase-negativa em águas e 343 de *Staphylococcus* coagulase-positiva em esfregaços), 287 deteções de *Salmonella* spp. em alimentos, 552 de *Listeria*

monocytogenes (470 em alimentos e 82 em esfregaços), 51 enumerações de bolores e leveduras em alimentos, 12 de *Pseudomonas aeruginosa* em águas e 86 de *Clostridium perfringens*, também em águas. Esta informação encontra-se representada, de forma resumida, no gráfico correspondente à **Figura 14**.

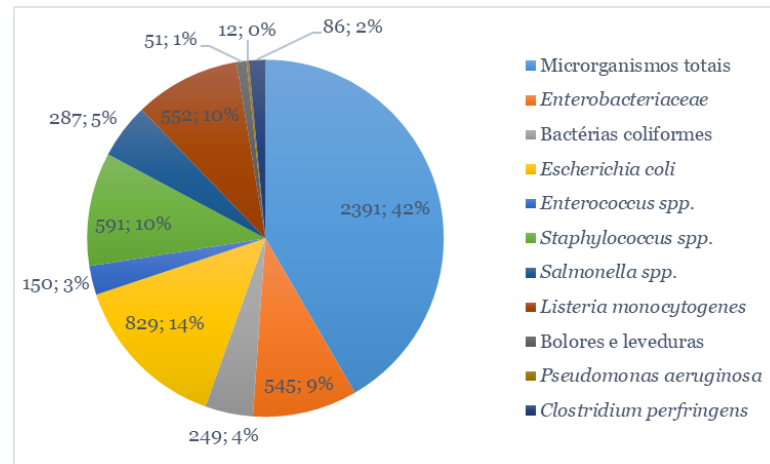


Figura 14. Representação gráfica do número de determinações analíticas efetuadas e respetiva distribuição por cada parâmetro.

4. Estudo – Análise da presença de *Escherichia coli* em queijos e águas de consumo

4.1. Objetivos

Neste estudo pretendeu-se avaliar a presença de bactérias da espécie *Escherichia coli* em dois tipos de amostras muito comumente analisadas no laboratório: queijos e águas de consumo. Quanto aos queijos o objetivo foi determinar a presença da bactéria mencionada em amostras recebidas, ao longo de quatro meses, de uma queijaria da região, a fim de que o produtor pudesse otimizar o processo de pasteurização utilizado na fase de produção do queijo e controlar o nível de higienização. Nas águas a finalidade principal foi a deteção e determinação do teor de *E. coli* e outras bactérias coliformes em águas recolhidas em furos de indivíduos particulares da região da Beira Interior, de modo a ter uma medida estatística do seu nível de contaminação.

4.2. Introdução

A *Escherichia coli* é uma das espécies de microrganismos mais pesquisadas e estudadas no mundo científico, sendo usada como microrganismo modelo em vários estudos devido à sua adaptabilidade, necessidade mínima de nutrientes, rápido ritmo de crescimento e genética bem estabelecida⁵¹. Esta constitui uma espécie de pequenos bacilos Gram-negativos de pontas arredondadas, que podem tomar a forma de cocos no interior do corpo e geralmente aparecem de modo singular, surgindo ocasionalmente em pares²³. A *E. coli* é um tipo ubíquo de bactérias, estando presente numa elevada diversidade de locais, entre alimentos, água, solos e o intestino de seres humanos e animais, sendo neste último caso, geralmente, inócua e desempenhando um papel fulcral no sistema digestivo⁵². Para além da sua faceta benéfica, a *E. coli* é um patógeno oportunista responsável por numerosas doenças, tanto gastrointestinais como de outros tipos, entre as quais se podem destacar a diarreia, enterite, bacteremia e infeções urinárias⁵³. As estirpes de *E. coli* diarreicas são ainda os patógenos bacterianos mais comuns no mundo, e são classificadas em seis categorias diferentes, tendo em conta as características clínicas, epidemiológicas, e de virulência: *E. coli* enteropatogénica (causa colibacilose – uma infeção aguda intestinal – principalmente em crianças até um ano de idade), *E. coli* enteroagregativa (caracterizada por um padrão de adesão agregativo,

devido a fatores de aderência agregativos), *E. coli* difusamente aderente (caracterizada por possuir um padrão de adesão difuso, devido aos genes de adesina Afa/Dr), *E. coli* enterotoxigénica (causa infecções semelhantes à cólera, especialmente em países de clima quente e higiene precária), *E. coli* enteroinvasiva (causa enterocolite com progressão semelhante à disenteria) e *E. coli* enterohemorrágica (também causa colibacilose principalmente em crianças, com possibilidade de desenvolvimento de um quadro de sangue e pus nas fezes em casos mais severos)^{23,54}. A via de transmissão de *E. coli* é sobretudo fecal-oral, ou seja, há uma grande prevalência de infecções causadas pela ingestão de alimentos ou águas contaminados, podendo, todavia, ser transmitida de pessoa para pessoa²³.

Face ao perigo que as doenças causadas por *E. coli* poderá significar para a saúde, para além da prevalência desta bactéria e da via principal de transmissão, é fundamental que se façam estudos sobre a mesma em produtos destinados ao consumo humano, neste caso alimentos e águas. Pelos motivos elencados, foram escolhidos para este estudo dois tipos de amostra em que este microrganismo poderá estar frequentemente presente, para além de serem de análise muito regular no laboratório, constituindo uma boa população de amostras.

O queijo é um produto alimentício caracterizado por uma instabilidade própria, devido ao facto de ser biológica e bioquimicamente dinâmico, e cuja segurança para o consumidor depende de vários fatores, como, por exemplo, a qualidade microbiológica do leite utilizado, a taxa e grau de acidificação durante o processo de fabrico, a atividade da água (a_w) do produto acabado e, para queijos que usam leite tratado termicamente, a eficiência da pasteurização do leite⁵⁵. Para além de contaminação direta no fabrico, esta também pode ocorrer em eventos de contaminação cruzada durante o processamento, no ambiente de venda ou em ambiente doméstico⁵⁶. As mãos dos trabalhadores e o manuseamento incorreto são, muitas vezes, a fonte de contaminação do queijo, sendo também comum a persistência de microrganismos que, devido à sua capacidade de formação de biofilme, aderem a superfícies e utensílios que não são corretamente higienizados⁵⁶. Um desses microrganismos é a *E. coli* que, apesar de não ser um parâmetro de avaliação da segurança/perigo para a saúde do queijo, é, segundo o Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, um indicador do nível de higiene do processo, sendo obrigatória a sua análise periódica nos queijos disponíveis para venda que sejam produzidos a partir de leite submetido a tratamento térmico²⁴.

Relativamente às águas destinadas ao consumo humano, para serem seguras para pessoas e animais, deverão ser totalmente livres de agentes patogénicos, caso contrário aumentam a incidência de diversas doenças⁵⁷. Os impactos das infeções decorrentes do consumo de água contaminada são mais preocupantes nos países em desenvolvimento, devido ao fornecimento irregular de água, alto nível de poluição da mesma e falta de infraestruturas que garantam a higiene⁵⁸, ainda que possam também ocorrer, embora em menor número, em países desenvolvidos. A *E. coli* é considerada o melhor indicador na monitorização da poluição da água, sendo usado há várias décadas, uma vez que está presente nas fezes dos mamíferos e consegue persistir na água durante 4 a 12 semanas⁵⁷. Esta espécie de bactérias, entre outros tipos de coliformes que também são usados como indicadores de contaminação, pode chegar às águas devido ao mau funcionamento de sistemas de esgotos e drenagem, escoamento de água de locais de criação de gado ou tratados com excrementos de animais ou devido à vida selvagem existente no local⁵⁹. Verifica-se também a crescente e recente contaminação de água com estirpes bacterianas resistentes a antibióticos, incluindo estirpes de *E. coli*, o que dificulta tanto o tratamento das infeções como a desinfecção da água⁶⁰. Pelas razões descritas, somos hoje levados, para além do uso de desinfetantes químicos, a aplicar técnicas adicionais para a eficaz eliminação deste microrganismo, como a utilização de radiação ultravioleta, técnicas de oxidação de superfície por plasma ou técnicas inovadoras, como o uso de fagos ou oxidantes como o bromo, cloro e permanganato de potássio⁵³.

4.3. Métodos

4.3.1. Análise de *E. coli* em queijos

Todas as amostras foram recolhidas na queijaria em estudo, sendo transportadas em malas térmicas e recebidas no laboratório, onde ficaram armazenadas a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ até ao momento da análise microbiológica propriamente dita. Esta análise foi feita segundo a norma ISO 16649-2:2001²⁷, ou seja, resumidamente, pesou-se cerca de 25 g de cada amostra para um saco de plástico próprio para *Stomacher* e adicionou-se citrato (Merck, Alemanha) em concentração 20 g/L, num volume adequado à obtenção da diluição inicial, conforme descrito na norma ISO 6887-1:2017¹¹. Seguiu-se o processamento dessa suspensão no equipamento *Stomacher* e posterior incorporação de 1 mL da suspensão em meio TBX (VWR Chemicals, Bélgica). Após a solidificação do mesmo, as placas incubaram a $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 4h, período após o qual foram transferidas para a estufa de temperatura $(44\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$, onde incubaram por 18 a 24h. No final fez-se a contagem das colónias azuis (se incontáveis, procedeu-se a diluições sucessivas, de modo a obter placas

com um número de colónias de contagem possível), traduzindo-se a mesma para concentração de *E. coli* na amostra através da expressão (3), apresentada a seguir.

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1+0,1n_2)d} \quad (3)$$

Legenda:

N – número de UFC de *Escherichia coli* presentes na amostra, por grama;

$\sum a$ – somatório das UFC das placas correspondentes a duas diluições sucessivas, quando efetuadas, ou contagem na placa obtida, quando efetuada apenas uma diluição;

V – volume do inóculo, em mL, incorporado em cada placa;

n_1 – número de placas correspondentes à primeira diluição;

n_2 – número de placas correspondentes à segunda diluição (caso não exista, $n_2 = 0$);

d – fator de diluição correspondente à primeira diluição utilizada.

Para interpretar os resultados obtidos recorreu-se à **Tabela 1**, semelhante à usada por Praça e colaboradores⁶¹ e baseada nos valores correspondentes aos queijos fabricados com leite ou soro de leite que tenha sido submetido a tratamento térmico, que constam do Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios²⁴.

Tabela 1. Critérios para a interpretação dos resultados microbiológicos obtidos em cada amostra, relativamente à quantidade de *E. coli* presente

Parâmetro indicador	Interpretação		
	Satisfatório	No limite	Insatisfatório
<i>E. coli</i>	< 10 UFC/g	10 – 100 UFC/g	> 100 UFC/g

4.3.2. Análise de *E. coli* em águas de consumo

A recolha das amostras de água em frascos estéreis adequados foi da responsabilidade de cada requisitante, tendo sido recebidas e analisadas imediatamente ou, quando necessário, armazenadas a $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ até ao momento da análise microbiológica propriamente dita. Esta baseou-se na norma ISO 9308-1:2014²², começando-se por filtrar a vácuo 100 mL de cada amostra através de um filtro com um diâmetro de poro de $0,45\ \mu\text{m}$, transferindo-se de seguida o filtro para uma placa contendo CCA (Oxoid, Reino Unido), assegurando a inexistência de bolhas entre o filtro e o meio, e incubando-se cada placa invertida na estufa programada a $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ por 21 a 24h. Após esse tempo fez-se a contagem das colónias azuis, correspondentes a UFC de *E. coli* (não carecem de confirmação), e das colónias rosa, correspondentes a outras bactérias coliformes. Estas últimas, após serem transferidas com o auxílio de uma ansa estéril para placas de PCA e

incubadas por mais 24h a $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$, foram confirmadas através do teste da oxidase, utilizando fitas de teste comerciais (Liofilchem, Itália). Consideraram-se positivas para colônias de bactérias coliformes todas as cujo resultado no teste da oxidase se revelou negativo.

4.4. Resultados

4.4.1. Análise de *E. coli* em queijos

De um total de 222 amostras analisadas, 72 eram de queijo de vaca e ovelha simples, 46 de queijo de vaca e ovelha apimentado, 66 de queijo de vaca e ovelha com especiarias, 7 de queijo de vaca e ovelha picante e 31 de queijo de vaca, ovelha e cabra (“Mistura”). Estas foram sendo recebidas no laboratório ao longo de 4 meses, distribuindo-se pelos dias conforme descrito na **Tabela 2**.

Tabela 2. Distribuição das amostras correspondentes aos vários tipos de queijo pelos dias em que foram recebidas no laboratório

Data	Simples	Apimentado	Especiarias	Picante	Mistura	Total
3 janeiro	3	1	1	0	0	5
5 janeiro	3	2	3	0	2	10
12 janeiro	3	2	3	0	2	10
16 janeiro	1	1	2	0	2	6
19 janeiro	2	2	2	0	1	7
23 janeiro	4	3	4	0	1	12
26 janeiro	5	1	2	0	0	8
30 janeiro	2	2	2	1	1	8
2 fevereiro	7	4	7	3	1	22
6 fevereiro	4	1	1	0	0	6
9 fevereiro	4	2	2	0	0	8
15 fevereiro	3	2	4	0	2	11
16 fevereiro	2	1	2	0	1	6
23 fevereiro	2	1	2	0	1	6
27 fevereiro	3	3	4	1	2	13
1 março	2	2	2	2	0	8
5 março	1	1	3	0	2	7
12 março	1	1	2	0	2	6
15 março	3	2	3	0	1	9
26 março	2	2	2	0	2	8
2 abril	6	2	2	0	2	12
5 abril	2	2	2	0	1	7
9 abril	1	1	3	0	2	7

Tabela 2 (continuação). Distribuição das amostras correspondentes aos vários tipos de queijo pelos dias em que foram recebidas no laboratório

16 abril	2	1	1	0	0	4
18 abril	3	3	1	0	1	8
23 abril	1	1	4	0	2	8

Dos queijos analisados verificou-se que, em 45, foi detetada *Escherichia coli* em concentração superior a 10 UFC/g, o que representa 20% das amostras. Em 29 desses queijos estava presente *E. coli* em concentração entre 10 e 100 UFC/g, representando 13% das amostras, e os restantes 16, constituindo 7% das amostras, tinham uma concentração desta bactéria superior a 100 UFC/g. No gráfico correspondente à **Figura 15** encontram-se resumidos estes resultados, para além da contabilização de amostras de cada tipo de queijo nas quais se detetou *E. coli* em quantidade superior a 10 UFC/g.

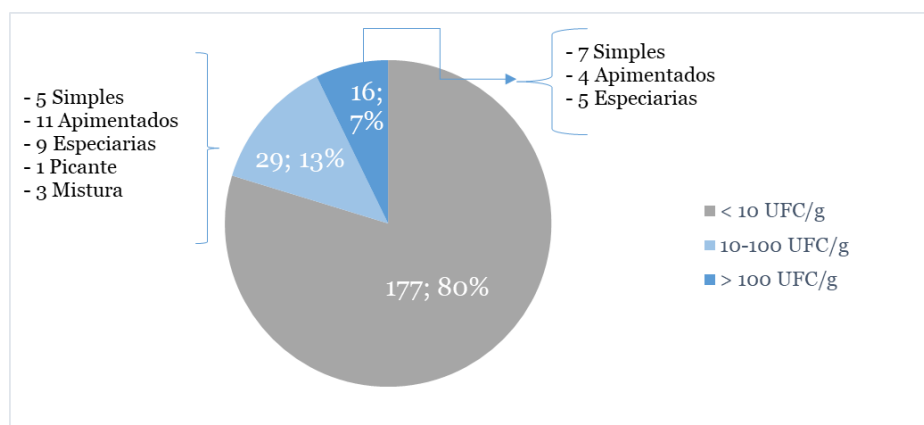


Figura 15. Gráfico da distribuição dos queijos analisados quanto à concentração de *Escherichia coli*

No gráfico apresentado de seguida (**Figura 16**), encontra-se representada a evolução ao longo dos 4 meses da percentagem de queijos, relativamente a todos queijos analisados no dia respetivo, que apresentam níveis de *E. coli* superiores a 10 UFC/g, níveis entre 10 e 100 UFC/g e níveis superiores a 100 UFC/g.

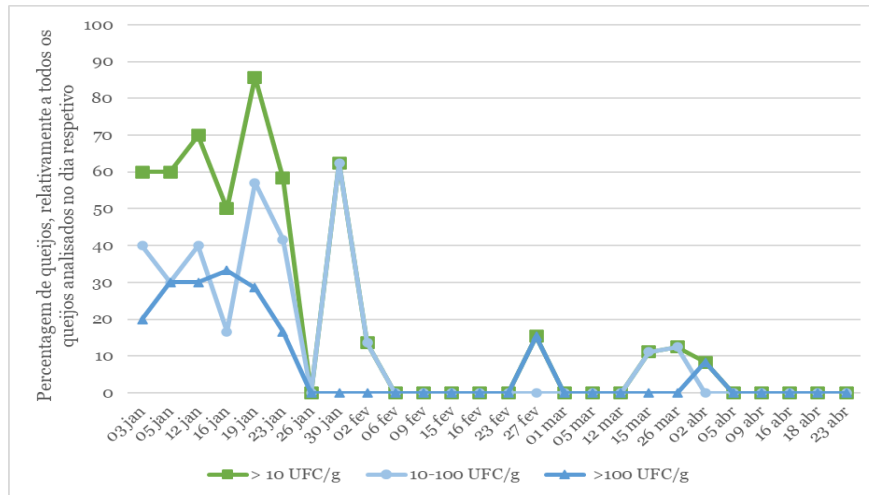


Figura 16. Evolução da percentagem de queijos cujos níveis de *E. coli* são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g

Seguidamente apresentam-se os gráficos da evolução dos parâmetros anteriores para cada um dos tipos de queijo: o simples, o apimentado, e de especiarias, o picante e o de mistura (**Figuras 17 a 21**).

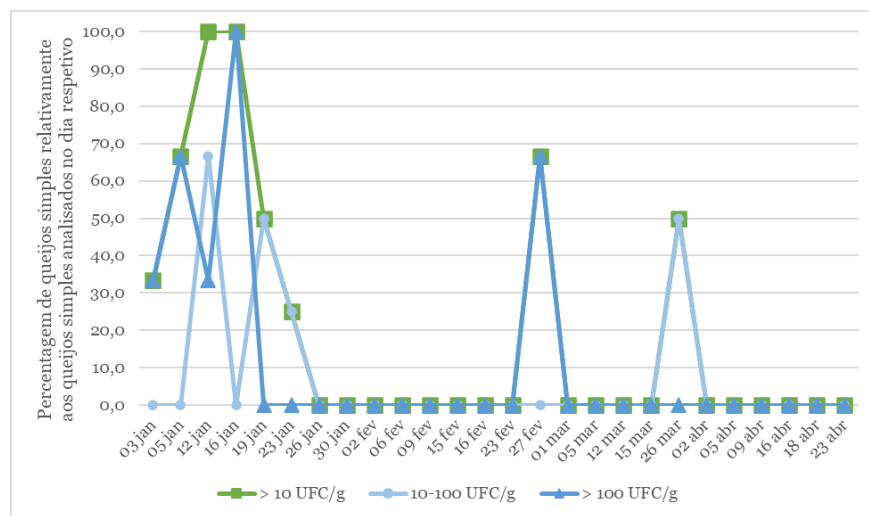


Figura 17. Evolução da percentagem de queijos simples cujos níveis de *E. coli* são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g

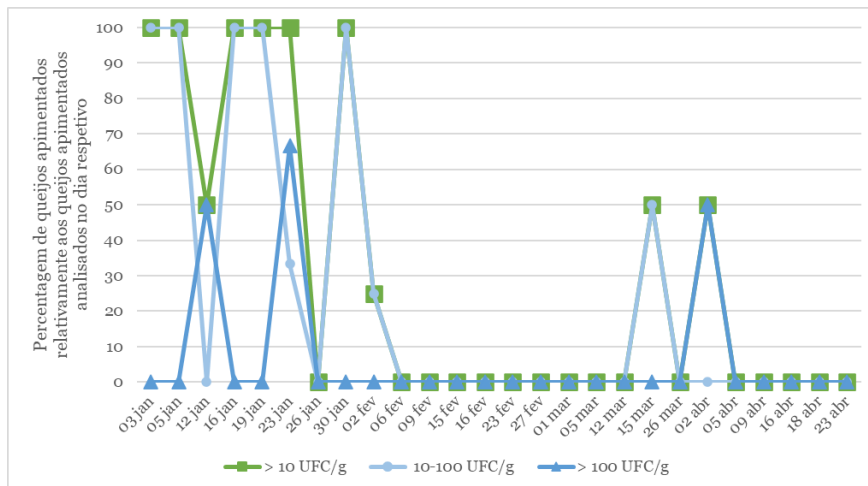


Figura 18. Evolução da percentagem de queijos apimentados cujos níveis de E. coli são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g

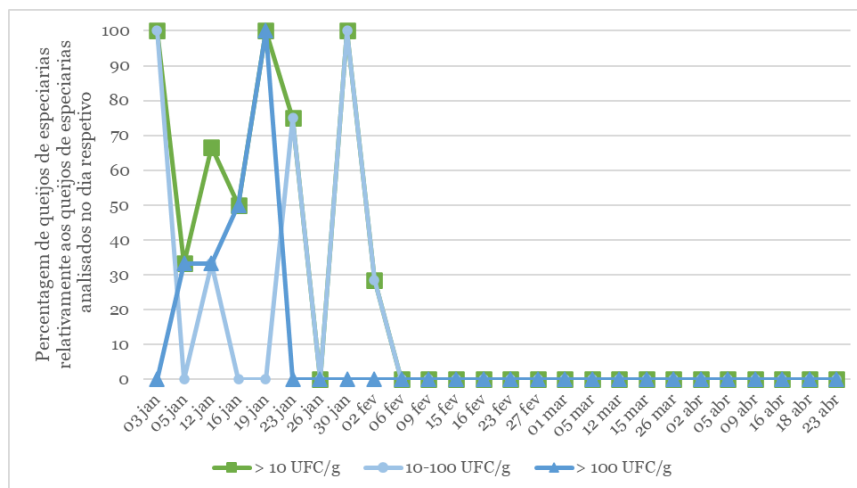


Figura 19. Evolução da percentagem de queijos de especiarias cujos níveis de E. coli são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g

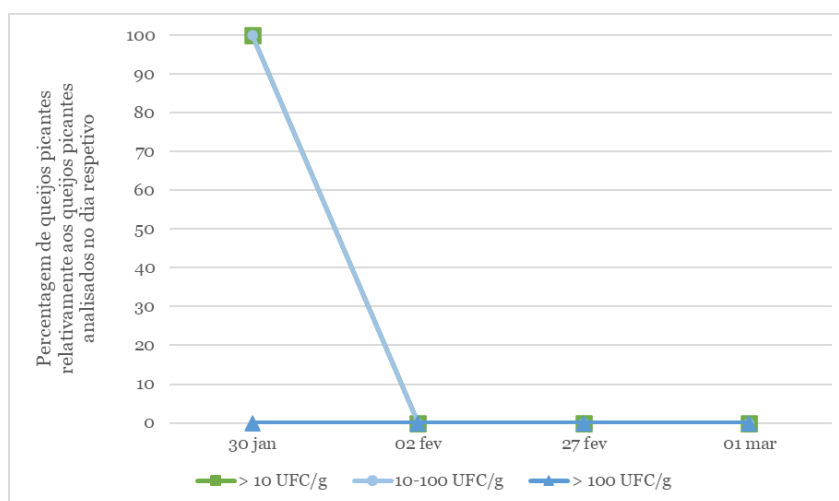


Figura 20. Evolução da percentagem de queijos picantes cujos níveis de E. coli são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g

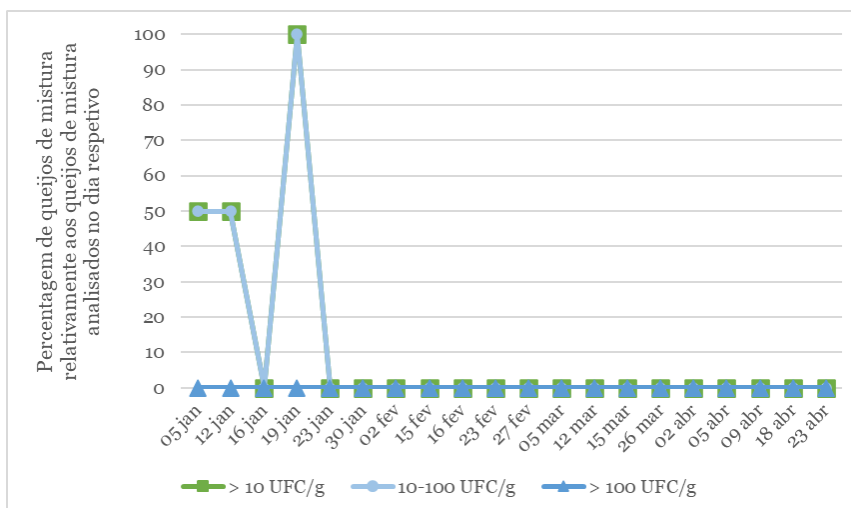


Figura 21. Evolução da percentagem de queijos de mistura cujos níveis de *E. coli* são, respetivamente, superiores a 10 UFC/g, se situam entre 10 e 100 UFC/g e são superiores a 100 UFC/g

4.4.2. Análise de *E. coli* em águas de consumo

Para esta parte do estudo foram analisadas, ao todo, 63 águas destinadas ao consumo humano, todas recolhidas na região da Beira Interior entre os dias 9 de janeiro e 23 de abril. Em 34 dessas amostras, representando 54% do universo de estudo, não se verificou qualquer contaminação por bactérias coliformes. Quanto às restantes 29, todas apresentavam esse tipo de contaminação, sendo que em 12 delas se detetou, para além de outros tipos de coliformes, a presença de *E. coli*. A **Figura 22** traduz o resumo dos resultados descritos.

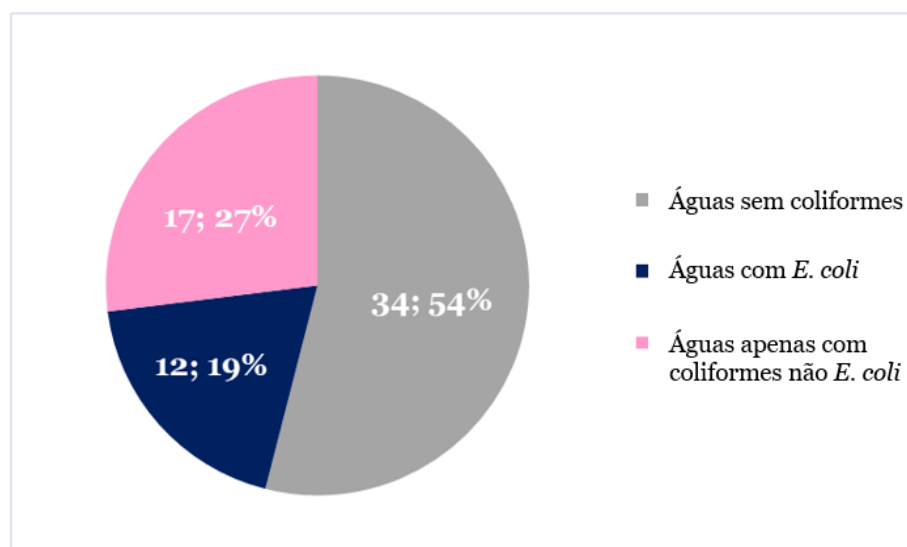


Figura 22. Gráfico da contabilização das águas analisadas quanto à presença de *E. coli* e outras bactérias coliformes

A **Tabela 3** mostra o nível de contaminação de cada uma das águas em que se obteve um resultado positivo para a presença de bactérias coliformes, medida em número de UFC/100 mL de cada tipo de bactéria, sendo os resultados ordenados e numerados do maior para o menor número de colônias de coliformes que cresceram na placa de CCA.

Tabela 3. Nível de contaminação das águas analisadas, em termos de quantidade de coliformes totais e de *E. coli*

Água	Coliformes (UFC/100 mL)	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)
1	>80	>80
2	>80	54
3	>80	2
4	>80	1
5	73	0
6	66	3
7	64	0
8	61	0
9	60	2
10	53	0
11	49	0
12	48	35
13	34	0
14	32	0
15	24	0
16	24	0
17	23	10
18	20	1
19	18	0
20	15	0
21	13	1
22	13	0
23	10	0
24	9	0
25	8	2
26	7	2
27	6	0
28	5	0
29	4	0

4.5. Discussão

Relativamente à primeira parte deste estudo, a análise de *E. coli* em queijos, foi efetuada a monitorização ao longo do tempo do nível de contaminação por esta bactéria nos queijos provenientes de uma só queijaria. Esta informação é útil para o fabricante uma vez que é um parâmetro usado na fase de teste do produto que mede a eficiência da higienização do processo de fabrico, sendo por isso usado para adotar ou não medidas de higiene mais rigorosas em pontos críticos. Um destes pontos é a fase de pasteurização do leite usado no fabrico destes queijos, o que explica o facto de a informação constante das análises ter sido utilizada para otimizar as condições desse tratamento térmico. O objetivo principal do estudo foi acompanhar os resultados das análises com a finalidade de demonstrar se essa otimização teria sido verdadeiramente eficaz. Como objetivo adicional, e uma vez que na empresa em causa são fabricadas diversas variedades de queijo, pretendeu-se averiguar para qual dessas variedades a linha de produção é mais problemática.

Como seria esperado e desejável, através da análise da **Figura 15** verifica-se que a grande maioria dos queijos analisados (80%) não apresentou sinais visíveis de contaminação por *E. coli* (concentração inferior a 10 UFC/g). Já a segunda maior fatia da população de amostras (13%) corresponde a queijos com valores de contaminação por este microrganismo no limite do considerado satisfatório de acordo com a legislação em vigor (concentração entre 10 e 100 UFC/g), o que, apesar de não ser muito problemático caso o produto fosse colocado à venda nessas condições, é caso para redobrar a atenção à higiene no processo produtivo. As amostras cujo resultado traduziu uma quantidade de *E. coli* superior a 100 UFC/g, são consideradas insatisfatórias de acordo com a legislação e, apesar de serem uma minoria (7%), a maior atenção no controlo da produção foi consequência da ocorrência das análises destas mesmas amostras.

Por análise da **Figura 16** observa-se que, relativamente ao primeiro mês de análises, na maior parte dos dias (a exceção foi 26 de janeiro, em que a contagem de *E. coli* foi igual a zero para todos os queijos), 50% ou mais das amostras analisadas em cada dia manifestaram a presença de *E. coli* em quantidade superior a 10 UFC/g, sendo, portanto, insatisfatórias ou estando no limite dos valores aceitáveis. Apesar de, na maioria das vezes, a quantidade de queijos no limite aceitável ser superior aos queijos classificados como insatisfatórios, este mês foi sem dúvida o mais preocupante em termos de número de queijos desta última categoria. Ao considerarmos janeiro o ponto de partida, este facto era algo expectável e significa que se teve de começar imediatamente a tomar medidas ao nível da higiene. O resultado dessas medidas é bem visível logo a partir do dia 30 de

janeiro, em que já não existiam amostras insatisfatórias, apesar de amostras com valores no limite ainda constituírem a maioria. Do segundo mês até ao fim do estudo, os resultados mantiveram-se sensivelmente razoáveis, já que a maior parte dos dias não se analisaram amostras que não fossem satisfatórias quanto à presença de *E. coli*. Todavia ainda se registaram dois picos na quantidade deste tipo de amostras, nomeadamente a 27 de fevereiro e de 15 de março a 2 de abril., apesar de serem ‘pequenos picos’, isto é, a quantidade destas amostras foi bastante mais baixa, quando comparada com quantidades registadas no início do estudo. Para além disso, note-se que, nos últimos 5 dias de análises todas elas resultaram em classificações satisfatórias, logo pode, em princípio, induzir-se que as condições de higiene estão bem controladas. Porém, para se ter a certeza deste facto, assegurando assim a qualidade e segurança do queijo produzido, deve continuar a analisar-se este parâmetro por mais tempo.

Quanto ao estudo diferencial consoante a variedade de queijo (**Figuras 17-21**), verificou-se que, para cada uma delas, a evolução temporal da quantidade de *E. coli* detetada foi bastante semelhante à verificada no estudo das amostras como um tipo único, sobretudo no que diz respeito ao facto de o primeiro mês ser o mais problemático em termos de quantidade de amostras insatisfatórias ou no limite. As variedades mais preocupantes são, indubitavelmente, as de queijo simples e apimentado. Estas, para além de terem múltiplos picos de amostras insatisfatórias e no limite aceitável no primeiro mês, estes eram bastante acentuados, tendo sido ainda as únicas variedades que apresentaram picos consideráveis depois do primeiro mês. Em comparação se acresce que, entre ambas, aquela a cuja linha de produção se deverá dar uma atenção superior no futuro será a do queijo apimentado, visto que foi a que registou uma amostra com resultado insatisfatório mais perto do fim do estudo. A explicação para este facto reside no modo como é produzido este tipo de queijo – a partir de queijo simples, há um passo adicional no processo, que corresponde ao revestimento do queijo em pimentão, passo esse que é feito manualmente e constitui uma etapa adicional de possível contaminação. Para as restantes variedades, a análise dos gráficos respetivos revela que foram as que resultaram num mais eficaz controlo higiénico da produção, visto que todas as amostras depois do primeiro mês (depois de 2 de fevereiro para o queijo de especiarias) se traduziram em resultados satisfatórios. É de ressaltar que no caso do queijo da variedade picante, o número de dias de análise foi muito baixo, logo o resultado não é tão fiável como os anteriormente discutidos. Recomendaria um estudo mais longo para esta variedade de queijo antes de se iniciar a sua comercialização.

Na segunda vertente do presente estudo, a análise de *E. coli* em águas de consumo, pretendeu-se aprofundar o conhecimento sobre esta bactéria, alargando a investigação

sobre a mesma a outra das amostras cuja análise é mais comum neste laboratório. O objetivo principal foi averiguar a extensão da sua presença em águas de clientes particulares da região da Beira Interior, averiguando a qualidade das mesmas. O estudo estendeu-se ainda a outras bactérias coliformes, uma vez que também são uma medida da contaminação da água, para além de que a análise é feita em simultâneo.

Observa-se na **Figura 22** que, das 63 amostras analisadas, 34 (54%) não apresentavam contaminação por bactérias coliformes. Este número, apesar de constituir mais de metade das amostras, é ainda assim uma percentagem bastante pequena. As restantes amostras continham coliformes, e são todas exemplos de não conformidade com a legislação em vigor quanto a águas de consumo, segundo o Decreto-Lei n.º 69/2023 de 21 de agosto, o qual define que as águas destinadas ao consumo humano deverão ter valores iguais a zero tanto para a análise dos coliformes totais como para a análise de *E. coli*²⁵.

A bactéria em foco neste estudo estava presente em 12 das águas analisadas, constituindo 19% das amostras. Este é um número considerável, tendo em conta o perigo que esta bactéria pode significar a nível da saúde, nomeadamente a nível das doenças que afetam o trato gastrointestinal. Caso os requisitantes pretendam consumir estas águas, devem tomar medidas no sentido de eliminar a presença deste tipo de bactérias, como o uso de desinfetantes, utilização de radiação ultravioleta e oxidação de superfície por plasma, podendo ainda ser testadas as novas abordagens, como o uso de fagos ou oxidantes. Os casos mais preocupantes são aqueles cuja contagem de colónias é incontável para algum dos parâmetros (amostras 1 a 4 da tabela 3), devendo por isso ser alvo de atenção imediata.

Este estudo é bastante limitado tanto a nível do número de águas analisadas, como do tipo de amostragem, que se baseou nas amostras que chegavam ao laboratório a pedido dos respetivos clientes, pelo que os resultados não deverão ser generalizados para retratar fielmente a qualidade das águas da região. Para além disso, as amostras deveriam ter sido repetidas para eliminar a probabilidade de erros de análise ou fatores ambientais transitórios que influenciasses os resultados. Contudo se considerarmos apenas os resultados obtidos, verificamos que há uma probabilidade considerável de encontrar bactérias coliformes, entre elas *E. coli*, em águas provenientes de furos. Por esta razão, será aconselhado a quem possuir uma fonte de água não conectada à rede de distribuição que pretenda utilizar para consumir, efetuar análises à mesma e tomar as medidas necessárias para não correr riscos de saúde desnecessários. Seria ainda útil fazer um estudo futuro mais abrangente da contaminação por *E. coli* das águas desta região,

com um número de amostras mais numeroso e recolhido metodicamente, alargando também a amostras de água recolhidas em vários pontos do sistema de distribuição.

4.6. Conclusão

Este estudo permitiu uma maior compreensão acerca das características e prevalência da *E. coli*. Verificou-se que esta bactéria é bastante útil na avaliação das condições de higiene e de contaminação fecal e foi com sucesso utilizada no controlo da higienização do processo de produção de queijos de uma queijaria, para além de avaliar o nível de contaminação de águas recolhidas em furos da região. Tendo em conta os efeitos adversos que a presença deste microrganismo significa em diversos aspetos, deverá continuar a ser estudado, de um modo mais alargado, tanto ao nível de queijos e outros alimentos como em águas não tratadas, cuja utilização ainda tem uma grande prevalência na nossa região, e águas disponíveis para consumo, de modo a garantir a segurança e saúde dos consumidores.

5. Conclusões

Considero que o estágio curricular retratado no presente relatório foi uma experiência com inúmeros pontos positivos. Este permitiu-me explorar um pouco o contexto de uma das áreas relacionadas com Bioquímica que mais me apaixona, a Microbiologia, sendo que, para além de me dar uma perspetiva mais informada de como esta tem utilidade no mundo real como parte integrante do controlo de qualidade e segurança de alimentos e águas, permitiu-me aprofundar e aplicar muitos dos conhecimentos adquiridos ao longo da licenciatura e do mestrado.

Durante o meu trabalho como estagiária no laboratório BR – Análises Ambientais e Alimentares, Lda., tive a oportunidade de realizar um grande número de ensaios analíticos microbiológicos, no início de forma orientada e, com o passar do tempo, de forma completamente autónoma. Além disso, percebi ainda como os dados provenientes de um laboratório de análises deste tipo podem contribuir para estudos relevantes, tendo conseguido efetuar um estudo focado na bactéria *Escherichia coli* aplicado a duas vertentes: a sua presença em alimentos (para o caso, queijos) e em águas de consumo. Para além do trabalho em si, foi-me ainda possível adquirir competências interpessoais através do contacto com a equipa, ao mesmo tempo que passei a compreender a mecânica de funcionamento e o ambiente vivido num laboratório profissional. Como consequência de tudo isto, creio que os objetivos de ganhar boas bases para a minha futura carreira profissional nesta área foram cumpridos com sucesso.

O presente relatório representa o culminar, não só do estágio curricular decorrido durante os últimos 8 meses, mas do meu percurso no mestrado em Bioquímica, representando ao mesmo tempo um novo começo, uma partida para o mundo profissional, para o qual me sinto hoje mais preparada.

6. Bibliografia

1. Castro M, Soares K, Ribeiro C, Esteves A. Evaluation of the Effects of Food Safety Training on the Microbiological Load Present in Equipment, Surfaces, Utensils, and Food Manipulator's Hands in Restaurants. *Microorganisms*. 2024;12(4):825. doi:10.3390/MICROORGANISMS12040825
2. De Oliveira Mota J, Boué G, Prévost H, et al. Environmental monitoring program to support food microbiological safety and quality in food industries: A scoping review of the research and guidelines. *Food Control*. 2021;130:108283. doi:10.1016/j.foodcont.2021.108283
3. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA J*. 2023;21(12):e8442. doi:10.2903/J.EFSA.2023.8442
4. De Bock T, Jacxsens L, Maes F, Van Meerhaeghe S, Reygaerts M, Uyttendaele M. Microbiological profiling and knowledge of food preservation technology to support guidance on a neutropenic diet for immunocompromised patients. *Front Microbiol*. 2023;14:1136887. doi:10.3389/FMICB.2023.1136887
5. Barielnu BK, Ulusoy BH, Kaynarca HD. DRINKING WATER MICROBIOLOGY: DESIRED AND UNDESIRED MICROBIOTA, LEGISLATION, OUTBREAKS AND ANALYSIS. *Carpathian J Food Sci Technol*. 2022;14(4):189-200. doi:10.34302/CRPJFST/2022.14.4.15
6. Instituto Português da Qualidade. *NP EN ISO/IEC 17025:2018 - Requisitos Gerais de Competência Para Laboratórios de Ensaio e Calibração.*; 2018.
7. International Organization for Standardization. *ISO 7218:2007 - Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – General Requirements and Guidance for Microbiological Examinations*. 3rd ed.; 2007.
8. Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect*. 2020;34:100622. doi:10.1016/j.nmni.2019.100622
9. Sandle T. Selection and Application of Culture Media. In: *Biocontamination Control for Pharmaceuticals and Healthcare*. Academic Press; 2019:103-123. doi:10.1016/B978-0-12-814911-9.00007-9
10. Sandle T. Microbiological culture media. In: *Pharmaceutical Microbiology*. Woodhead Publishing; 2016:47-61. doi:10.1016/B978-0-08-100022-9.00005-0

11. International Organization for Standardization. *ISO 6887-1:2017 - Microbiology of the Food Chain – Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination – Part 1: General Rules for the Preparation of the Initial Suspension and Decimal Dilutions*. 1st ed.; 2017.
12. International Organization for Standardization. *ISO 18593:2018 - Microbiology of the Food Chain – Horizontal Methods for Surface Sampling*. 2nd ed.; 2018.
13. Tang JYH. Detection of Microbiological Hazards. In: *Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry*. 2nd ed. Academic Press; 2023:835-850. doi:10.1016/B978-0-12-820013-1.00002-4
14. International Organization for Standardization. *ISO 4833-1:2013 - Microbiology of the Food Chain – Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms – Part 1: Colony Count at 30 °C by the Pour Plate Technique*. 1st ed.; 2013.
15. International Organization for Standardization. *ISO 6222:1999 - Water Quality – Enumeration of Culturable Micro-Organisms – Colony Count by Inoculation in a Nutrient Agar Culture Medium*. 2nd ed.; 1999.
16. Mladenović KG, Grujović MŽ, Kiš M, et al. *Enterobacteriaceae* in food safety with an emphasis on raw milk and meat. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105(23):8615-8627. doi:10.1007/s00253-021-11655-7
17. de Gouveia MIM, Bernalier-Donadille A, Jubelin G. *Enterobacteriaceae* in the Human Gut: Dynamics and Ecological Roles in Health and Disease. *Biology (Basel)*. 2024;13(3):142. doi:10.3390/BIOLOGY13030142
18. Baldelli V, Scaldaferrri F, Putignani L, Del Chierico F. The Role of *Enterobacteriaceae* in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms*. 2021;9(4):697. doi:10.3390/MICROORGANISMS9040697
19. Shen C, Zhang Y. Total plate counts & coliform counts of pond water. In: *Introductory Microbiology Lab Skills and Techniques in Food Science*. Academic Press; 2022:143-148. doi:10.1016/B978-0-12-821678-1.00003-4
20. Erkmen O. Isolation and counting of coliforms and *Escherichia coli*. In: *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments*. Academic Press; 2022:105-140. doi:10.1016/B978-0-323-91651-6.00051-3
21. International Organization for Standardization. *ISO 4832:2006 - Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Coliforms – Colony-Count Technique*. 3rd ed.; 2006.

22. International Organization for Standardization. *ISO 9308-1:2014 - Water Quality – Enumeration of Escherichia Coli and Coliform Bacteria – Part 1: Membrane Filtration Method for Waters with Low Bacterial Background Flora*. 3rd ed.; 2014.
23. Gaitaev AE, Kiskaeva AKP, Mutalimov DA, Abdulkarimov DK, Korkmazova AP, Bekishieva AR. Biological Properties of Escherichia coli. Symptoms and Diagnosis of Colibacillosis. *Entomol Appl Sci Lett*. 2023;10(1):112-118. doi:10.51847/KDXTBPD3WD
24. European Commission. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off J Eur Communities*. Published online 2005.
25. Decreto-Lei n.º 69/2023. *Diário da República*. 2023;161(I):10-73.
26. Poulouxi S, Prodromidis MI. Indirect determination of *Escherichia coli* based on β -D-glucuronidase activity and the voltammetric oxidation of phenolphthalein at graphite screen-printed electrodes. *J Electroanal Chem*. 2020;879:114752. doi:10.1016/J.JELECHEM.2020.114752
27. International Organization for Standardization. *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*. 1st ed.; 2001.
28. Tamai S, Suzuki Y. Diversity of Fecal Indicator Enterococci among Different Hosts: Importance to Water Contamination Source Tracking. *Microorganisms*. 2023;11(12):2981. doi:10.3390/MICROORGANISMS11122981
29. Viorel SV, Carmen CV, Gheorghe V. MICROBIOLOGICAL MONITORING OF WATER SUPPLY BY INTESTINAL ENTEROCOCCI USING THE MEMBRANE FILTRATION METHOD. *Fresenius Environ Bull*. 2021;30(7):8252-8259.
30. International Organization for Standardization. *ISO 7899-2:2000 - Water Quality – Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci – Part 2: Membrane Filtration Method*. 2nd ed.; 2000.
31. González-Martín M, Corbera JA, Suárez-Bonnet A, Tejedor-Junco MT. Virulence factors in coagulase-positive staphylococci of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. *Vet Q*. 2020;40(1):118-131. doi:10.1080/01652176.2020.1748253

32. Abdeen EE, Mousa WS, Abdelsalam SY, et al. Prevalence and Characterization of Coagulase Positive *Staphylococci* from Food Products and Human Specimens in Egypt. *Antibiotics*. 2021;10(1):75. doi:10.3390/antibiotics10010075
33. International Organization for Standardization. *ISO 6888-2:2021 - Microbiology of the Food Chain – Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase-Positive Staphylococci (Staphylococcus Aureus and Other Species) – Part 2: Method Using Rabbit Plasma Fibrinogen Agar Medium*. 2nd ed.; 2021.
34. Instituto Português da Qualidade. *NP 4343:1998 - Qualidade Da Água. Pesquisa e Quantificação de Estafilococos*. 1st ed.; 1998.
35. Agregán R, Munekata PES, Zhang W, Zhang J, Pérez-Santaescolástica C, Lorenzo JM. High-pressure processing in inactivation of *Salmonella* spp. in food products. *Trends Food Sci Technol*. 2021;107:31-37. doi:10.1016/J.TIFS.2020.11.025
36. Ehuwa O, Jaiswal AK, Jaiswal S. *Salmonella*, Food Safety and Food Handling Practices. *Foods*. 2021;10(5):907. doi:10.3390/FOODS10050907
37. International Organization for Standardization. *ISO 6579-1:2017 - Microbiology of the Food Chain – Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of Salmonella – Part 1: Detection of Salmonella Spp*. 1st ed.; 2017.
38. Orsi RH, Liao J, Carlin CR, Wiedmann M. Taxonomy, ecology, and relevance to food safety of the genus *Listeria* with a particular consideration of new *Listeria* species described between 2010 and 2022. *MBio*. 2024;15(2):e0093823. doi:10.1128/MBIO.00938-23
39. Palaiodimou L, Fanning S, Fox EM. Genomic insights into persistence of *Listeria* species in the food processing environment. *J Appl Microbiol*. 2021;131(5):2082-2094. doi:10.1111/JAM.15089
40. Osek J, Wiczorek K. Why does *Listeria monocytogenes* survive in food and food-production environments? *J Vet Res*. 2023;67(4):537-544. doi:10.2478/JVETRES-2023-0068
41. International Organization for Standardization. *ISO 11290-1:2017 - Microbiology of the Food Chain – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of Listeria Monocytogenes and of Listeria Spp. – Part 1: Detection Method*. 2nd ed.; 2017.
42. Xu L, Ntakatsane M, Wang L, et al. Improved sensitive fluorescent/visible dual detection count plate for mold and yeast in food. *Food Control*. 2021;128:108174. doi:10.1016/J.FOODCONT.2021.108174

43. Pınarlı Ç, Tarlak F. MICROORGANISMS RESPONSIBLE FOR DETERIORATION OF FOOD PRODUCTS: REVIEW. *Carpathian J Food Sci Technol.* 2022;14(4):201-215. doi:10.34302/crpjfst/2022.14.4.16
44. Instituto Português da Qualidade. *NP 3277-1:1987 - Microbiologia Alimentar. Contagem de Bolors e Leveduras. Parte 1: Incubação a 25°C.*; 1987.
45. Diggle SP, Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology.* 2020;166(1):30-33. doi:10.1099/mic.0.000860
46. Wei L, Wu Q, Zhang J, et al. Prevalence, Virulence, Antimicrobial Resistance, and Molecular Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Drinking Water in China. *Front Microbiol.* 2020;11:544653. doi:10.3389/fmicb.2020.544653
47. International Organization for Standardization. *ISO 16266:2006 - Water Quality – Detection and Enumeration of Pseudomonas Aeruginosa – Method by Membrane Filtration.* 1st ed.; 2006.
48. Gohari IM, Navarro MA, Li J, Shrestha A, Uzal F, McClane BA. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence.* 2021;12(1):723-753. doi:10.1080/21505594.2021.1886777
49. Camargo A, Ramírez JD, Kiu R, Hall LJ, Muñoz M. Unveiling the pathogenic mechanisms of *Clostridium perfringens* toxins and virulence factors. *Emerg Microbes Infect.* 2024;13(1):2341968. doi:10.1080/22221751.2024.2341968
50. International Organization for Standardization. *ISO 14189:2013 - Water Quality – Enumeration of Clostridium Perfringens – Method Using Membrane Filtration.* 1st ed.; 2013.
51. Basavaraju M, Gunashree BS. *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics. In: *Escherichia Coli - Old and New Insights.* IntechOpen; 2022. doi:10.5772/INTECHOPEN.105508
52. Rubab M, Oh DH. Virulence Characteristics and Antibiotic Resistance Profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Diverse Sources. *Antibiotics.* 2020;9(9):587. doi:10.3390/ANTIBIOTICS9090587
53. Xu C, Kong L, Liao Y, et al. Mini-Review: Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* from Farm Animal-Associated Sources. *Antibiotics.* 2022;11(11):1535. doi:10.3390/ANTIBIOTICS11111535

54. Spano LC, da Cunha KF, Monfardini MV, Fonseca R de CB, Scaletsky ICA. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):773. doi:10.1186/s12879-017-2872-0
55. Primavilla S, Roila R, Rocchegiani E, et al. Assessment of the Microbiological Safety and Hygiene of Raw and Thermally Treated Milk Cheeses Marketed in Central Italy between 2013 and 2020. *Life.* 2023;13(12):2324. doi:10.3390/LIFE13122324
56. Mendonça R, Furtado R, Coelho A, et al. Raw milk cheeses from Beira Baixa, Portugal—A contributive study for the microbiological hygiene and safety assessment. *Brazilian J Microbiol.* 2024;55(2):1759-1772. doi:10.1007/s42770-024-01332-y
57. Soares AS, Miranda C, Coelho AC, Trindade H. Occurrence of Coliforms and Enterococcus Species in Drinking Water Samples Obtained from Selected Dairy Cattle Farms in Portugal. *Agriculture.* 2023;13(4):885. doi:10.3390/AGRICULTURE13040885
58. Rahman MM, Kunwar SB, Bohara AK. The interconnection between water quality level and health status: An analysis of *Escherichia Coli* contamination and drinking water from Nepal. *Water Resour Econ.* 2021;34:100179. doi:10.1016/J.WRE.2021.100179
59. Odetoyin B, Ogundipe O, Onanuga A. Prevalence, diversity of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and associated risk factors in well water in Ile-Ife, Southwestern Nigeria. *One Heal Outlook.* 2022;4(1):3. doi:10.1186/S42522-021-00057-4
60. Sérgio J, Marques AP, Huertas R, Crespo JG, Pereira VJ. Occurrence and Treatment of Antibiotic-Resistant Bacteria Present in Surface Water. *Membranes (Basel).* 2023;13(4):425. doi:10.3390/MEMBRANES13040425
61. Praça J, Furtado R, Coelho A, et al. *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and Coagulase Positive Staphylococci in Cured Raw Milk Cheese from Alentejo Region, Portugal. *Microorganisms.* 2023;11(2):322. doi:10.3390/MICROORGANISMS11020322