



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Sobrevivência de *Arcobacter butzleri* quando sujeito a condições de stress**

**Carolina Carvalho Batista**

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

Orientadora: Doutora Susana Ferreira  
Coorientadora: Prof. Doutora Fernanda Domingues

**Covilhã, janeiro de 2020**



# Dedicatória

Aos meus pais Adelaide e José Joaquim.



# Agradecimentos

No final desta etapa, tenho de agradecer a várias pessoas pelo apoio fundamental que me foi dado.

Começar por agradecer à Universidade da Beira Interior que me acolheu ao longo destes seis anos de percurso académico e ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde por me ter proporcionado a execução deste trabalho.

À Doutora Susana Ferreira pela excelente orientação, tempo dispensado, preocupação e grande paciência ao longo deste ano de trabalho.

À Professora Doutora Fernanda Domingues por todo o apoio prestado ao longo destes meses de trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, ao Igor, à Alexandra, ao Rodrigo, à Rita e à Cristiana pela companhia, pela constante animação na Micro I, pela ajuda e pela amizade que me prestaram.

Aos meus amigos, à minha família da Covilhã, ao João Diogo, á Ana, à Rita, ao João Valente, ao Alexandre e ao Tiago pela amizade, pelo apoio e compreensão nesta etapa, pela partilha de bons momentos ao longo destes seis anos e pela familiaridade que me prestaram.

Aos meus amigos de infância ao Diogo, à Ana e à Eva pela amizade e pelo apoio que me prestaram agora e sempre.

Mas o meu maior agradecimento é á minha família aos meus pais, ao meu irmão, à Susana e ao Hugo e à minha avó pelo apoio que me deram em todos os momentos, pela preocupação e pelos esforços que fizeram para me verem realizada e seguir os meus sonhos.

Um muito obrigada a todos!



## Resumo

Na última década, os estudos em *Arcobacter* spp. têm vindo a intensificar-se para colmatar a falta de conhecimento ao nível da patogenicidade, resistência e sobrevivência deste microrganismo. Algumas das espécies de entre o género *Arcobacter* são vistas como uma preocupação para a saúde pública e também para a segurança alimentar devido à sua associação a doenças tanto em humanos como em animais e também à sua elevada distribuição em alimentos, ambiente de processamento alimentar ou águas de consumo humano. De entre as 30 espécies do género *Arcobacter*, *Arcobacter butzleri* foi incluído na lista de microrganismos considerados um perigo grave para a saúde humana, pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos. No entanto, ainda pouco se sabe relativamente à sua capacidade de sobrevivência e persistência em alimentos, tal como à sobrevivência de *A. butzleri* em condições de stress associadas ao processamento alimentar e condições de higienização. Assim, o objetivo deste trabalho passou por avaliar a capacidade de sobrevivência de *A. butzleri* na ausência e presença de matrizes alimentares (frango e alface) quando sujeito a condições de stress (temperatura de 55 °C, vinagre e AMUKINA). Quando se avaliou a capacidade de sobrevivência de *A. butzleri* na ausência de matrizes alimentares, em geral existiu uma elevada redução do número de células para todas as condições de stress estudadas, isto é, para o tratamento térmico ocorreu uma redução na sobrevivência de *A. butzleri* e a aplicação do vinagre e AMUKINA levou à eliminação de *A. butzleri*. No entanto, na presença de matrizes alimentares a redução da sobrevivência não se mostrou tão acentuada como na ausência de matrizes alimentares, ou seja, estes tratamentos deixaram de ser eficazes para algumas estirpes, ocorrendo uma diminuição da atividade da temperatura, do vinagre e da AMUKINA na eliminação de *A. butzleri*. Concluindo-se assim, que apesar da eficácia da temperatura, vinagre e AMUKINA na eliminação de *A. butzleri* na ausência de matrizes alimentares, estas influenciam os processos de processamento alimentar e higienização, apontando assim um potencial perigo para a saúde do consumidor.

## Palavras-chave

*Arcobacter butzleri*, Sobrevivência, Matrizes alimentares, Condições de stress, Processamento alimentar



# Abstract

In the last decade, an intensification of studies regarding *Arcobacter* spp. has occurred, in order to fulfil the lack of knowledge that still exists about subjects as pathogenicity levels, resistance and survival of this microorganism. Some of the species among the genus *Arcobacter* are seen as a concern to public health, as well as to food safety, due to its association to illness in humans and in animals, and also due to its high distribution in food, food processing environments or water for human consumption. Among the 30 species of the *Arcobacter* genus, *Arcobacter butzleri* was included in the list of microorganisms that are considered serious hazard to human health by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods. In the meantime, a limited knowledge about its survival capacity and persistence in foods still exists, such as the survival of the *A. butzleri* in conditions of stress associated with food processing and hygienization conditions. Therefore, the aim of this work was to evaluate the survival capacity of the *A. butzleri* in the presence and absence of food matrixes (chicken and lettuce), when submitted to stress conditions (temperature of 55 °C, vinegar and AMUKINA). When the survival ability of the *A. butzleri* was evaluated in the absence of food matrixes, in a general manner, it was observable a high decline of the number of cells for all the stress conditions evaluated in this study. As to what concerns the other stress conditions, for the thermal treatment a reduction in the survival of the *A. butzleri* was noticeable, and in the group submitted to vinegar and AMUKINA an elimination of the *A. butzleri* was verified. However, in the presence of food matrixes the survival reduction was not as accentuated as in the absence of food matrixes, that is, these treatments stopped being effective for some strains of this bacterial group, being therefore evidenced a decrease in the effectiveness of the temperature, vinegar and AMUKINA in the elimination of the *A. butzleri*. In sum, despite the effectiveness of the temperature, vinegar and AMUKINA in the elimination of *A. butzleri* in the absence of food matrixes, the food matrixes influenced the course of food processing and hygienization, pointing towards a hazard for the consumer's health.

## Keywords

*Arcobacter butzleri*, Survival, Food matrixes, Stress conditions, Food processing



# Índice

Capítulo 1: Introdução .....	3
1.1 Características gerais do género <i>Arcobacter</i> .....	3
1.1.1 Revisão taxonómica do género <i>Arcobacter</i> .....	3
1.1.2 Principais características do género <i>Arcobacter</i> .....	4
1.2 Descoberta e características de <i>Arcobacter butzleri</i> .....	5
1.2.1. <i>Arcobacter butzleri</i> .....	7
1.3 Distribuição de <i>Arcobacter butzleri</i> .....	7
1.3.1 Isolamento de <i>Arcobacter butzleri</i> a partir de água .....	8
1.3.2 Isolamento de <i>Arcobacter butzleri</i> em fábricas de processamento de alimentos.....	9
1.3.3 Isolamento de <i>Arcobacter butzleri</i> a partir de alimentos .....	10
1.4 Sobrevivência de <i>Arcobacter butzleri</i> em condições de stress associadas ao setor alimentar .....	13
1.4.1 Stress térmico.....	14
1.4.2 Stress ácido .....	17
1.4.3 Stress químico .....	18
Capítulo 2: Objetivos .....	23
Capítulo 3: Materiais e Métodos .....	25
3.1 Microrganismos usados neste estudo .....	25
3.2 Reagentes .....	25
3.3 Equipamentos .....	26
3.4 Armazenamento e preparação das estirpes .....	26
3.5 Preparação da suspensão celular a usar nos ensaios de sobrevivência de <i>Arcobacter butzleri</i> a condições de stress .....	27
3.6 Avaliação da sobrevivência de <i>Arcobacter butzleri</i> quando sujeito a condições de stress, na ausência de matrizes alimentares.....	27
3.7 Avaliação da sobrevivência de <i>Arcobacter butzleri</i> em matrizes alimentares, quando sujeito a condições de stress .....	28
3.7.1 Avaliação do efeito de stress térmico em <i>Arcobacter butzleri</i> na presença de peito de frango .....	29
3.7.2 Avaliação do efeito de stress ácido e químico em <i>Arcobacter butzleri</i> na presença de alface <i>iceberg</i> .....	30
Capítulo 4: Resultados e Discussão .....	31
4.1 Sobrevivência de <i>Arcobacter butzleri</i> quando sujeito a diferentes condições de stress na ausência de matrizes alimentares .....	31
4.1.1 Efeito do stress térmico na sobrevivência de <i>Arcobacter butzleri</i> .....	33
4.1.3 Efeito do stress ácido na sobrevivência de <i>Arcobacter butzleri</i> .....	35

4.1.3 Efeito do stress químico na sobrevivência de <i>Arcobacter butzleri</i> .....	38
4.2 Sobrevivência das estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> às diferentes condições de stress na presença de matrizes alimentares.....	40
4.2.1 Efeito do stress térmico na sobrevivência de <i>Arcobacter butzleri</i> na presença de peito de frango .....	42
4.2.3 Efeito do stress ácido na sobrevivência de <i>Arcobacter butzleri</i> na presença de alface iceberg.....	44
4.2.2 Efeito do stress químico na sobrevivência de <i>Arcobacter butzleri</i> na presença de alface iceberg.....	50
Capítulo 5: Conclusões .....	55
Perspetivas Futuras .....	57
Referências bibliográficas .....	59
Anexos .....	67

## Lista de Figuras

Figura 1. Visão esquemática da distribuição de *Arcobacter* na cadeia alimentar. Adaptado de (Ferreira et al., 2019).

Figura 2. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* DQ40A1, AB28/11, CR21-1, CR42-4, A6-1, INSA2808 quando expostos à temperatura ambiente na ausência de matrizes alimentares. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Figura 3. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* DQ40A1, AB28/11, CR21-1, CR42-2, A6-1, INSA2808 quando expostas ao tratamento térmico de 55 °C na ausência de matrizes alimentares. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Figura 4. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* DQ40A1, AB28/11, CR21-1, CR42-2, A6-1, INSA2808 quando expostas ao tratamento com o vinagre na ausência de matrizes alimentares. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Figura 4. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* DQ40A1, AB28/11, CR21-1, CR42-4, A6-1, INSA2808 quando exposta ao tratamento com AMUKINA na ausência de matrizes alimentares. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Figura 5. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* A6-1, AB28/11, CR21-1, DQ40A1, INSA2808 quando expostos à temperatura ambiente na presença da matriz alimentar, carne de frango. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Figura 6. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* A6-1, AB28/11, INSA2808, DQ40A1, CR21-1 quando exposta ao tratamento térmico na presença da matriz alimentar, carne de frango. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Figura 7. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* A6-1, AB28/11, CR21-1, INSA2808 e DQ40A1 quando expostas à temperatura ambiente na presença da matriz alimentar, alface *iceberg*, após incubação das estirpes com a alface durante 24 horas em refrigeração. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Figura 9. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* A6-1, CR21-1, DQ40A1, INSA2808 e AB28/11 quando expostas ao tratamento com o vinagre a 15 % (V/V) na presença da matriz

alimentar, alface *iceberg*. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Figura 10. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* A6-1, CR21-1, DQ40A1, INSA2808 e AB28/11 quando expostas ao tratamento com AMUKINA 2% (V/V) na presença da matriz alimentar, alface *iceberg*. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Espécies de *Arcobacter* propostas e aceites por ano e origem do isolado. Adaptado dos artigos: (Hsu & Lee, 2015; Pérez-Cataluña et al., 2018b; Pérez-Cataluña et al., 2018c; Callbeck et al., 2019)

Tabela 2. Distribuição global de *Arcobacter butzleri* em vários tipos de água. Adaptado de (Hsu & Lee, 2015; Ferreira et al., 2019)

Tabela 3. Distribuição global de *Arcobacter butzleri* em várias fábricas de processamento de alimentos. Adaptado de (Hsu & Lee, 2015; Ferreira et al., 2019)

Tabela 4. Distribuição global de *Arcobacter butzleri* em alimentos. Adaptado de (Hsu & Lee, 2015; Ferreira et al., 2019)

Tabela 5. Ensaio de sobrevivência de isolados de *Arcobacter butzleri* em condições de escaldamento (Ho et al., 2008)

Tabela 6. Crescimento de *Arcobacter butzleri* em diferentes valores de pH e diferentes ácidos orgânicos (Cervenka et al., 2003)

Tabela 7. Tempo necessário para a eliminação de diferentes microrganismos quando sujeitos à AMUKINA a 5 %. Adaptado de (Ferreira, 2009)

Tabela 7. Origem das estirpes utilizadas no trabalho laboratorial

Tabela 8. Reagentes utilizados no trabalho laboratorial

Tabela 9. Equipamentos utilizados no trabalho laboratorial

Tabela 10. Número de células inicial para as estirpes de *Arcobacter butzleri* antes e depois da incubação a 4 °C durante 24 horas



## Lista de Acrónimos

BA	do inglês “ <i>Blood Agar</i> ”
BHI	do inglês “ <i>Brain Heart Infusion</i> ”
OD <sub>620nm</sub>	Densidade ótica a 620 nm
HACCP	do inglês “ <i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i> ”
ICMSF	do inglês “ <i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i> ”
UFC	Unidades formadoras de colónias
TSA	do inglês “ <i>Tryptic Soy Agar</i> ”
TSB	do inglês “ <i>Tryptic Soy Broth</i> ”



# Comunicações científicas

## Comunicação em forma de poster de parte deste trabalho de Mestrado

Batista C., Domingues F., Ferreira S. “Sobrevivência de *Arcobacter butzleri* quando sujeito a condições de stress”, IV Jornadas Educação e Investigação em Saúde Instituto Politécnico da Guarda Escola superior de Saúde, Guarda, Portugal- 12 de dezembro 2019



# Capítulo 1: Introdução

Na última década, os estudos sobre *Arcobacter* spp. têm vindo a intensificar-se, muito devido à falta de conhecimento acerca deste microrganismo. Algumas das espécies de entre o género *Arcobacter* são vistas como uma preocupação para a saúde pública e também para a segurança alimentar, devido à sua associação a doenças tanto em humanos como animais, e à sua elevada distribuição. *Arcobacter* spp. podem ser isolados de alimentos, de ambientes de processamento alimentar e também isolados de águas de consumo humano (Ferreira et al., 2017). Atualmente, o estudo deste microrganismo torna-se relevante, pois o conhecimento sobre patogenicidade, resistência e sobrevivência ainda é muito limitado.

## 1.1 Características gerais do género *Arcobacter*

O género *Arcobacter* foi descoberto no século XX, mais propriamente, na década de 80, mas o seu estudo e a preocupação com as suas implicações na saúde pública foram intensificados somente nos últimos 10 anos (Faccini dos Santos et al., 2012). *Arcobacter* spp. foi descoberto pelo isolamento de organismos a partir de fetos de bovinos e de suínos (Vandamme et al., 1992). Este género pertence à família *Campylobacteraceae*, que compreende dois outros géneros *Campylobacter* e *Sulfurospirillum* (Ferreira et al., 2017). Esta família é considerada como a maior e mais diversificada família, pertencente à classe *Epsilonproteobacteria*. A diversidade desta família é associada não só à grande variedade de ambientes dos quais estas bactérias têm sido isoladas, mas também pela heterogeneidade filogenética existente em cada um dos três géneros (Collado & Figueras, 2011).

### 1.1.1 Revisão taxonómica do género *Arcobacter*

Recentemente, foi sugerida uma revisão taxonómica, a qual aponta para a divisão do género *Arcobacter*, considerando a grande variabilidade genómica e sugerindo também várias combinações fenotípicas diferenciadoras entre os vários géneros (Pérez-Cataluña et al., 2018a). A revisão da taxonomia admite a divisão do atual género *Arcobacter* em pelo menos sete géneros diferentes, denominados de *Arcobacter*, *AliiArcobacter*, *PseudoArcobacter*, *HaloArcobacter*, *Malacobacter*, *Poseidonibacter* e *Arcomarinus* (Pérez-Cataluña et al., 2018a). Estes novos géneros seriam integrados numa nova família *Arcobacteraceae* a qual pertenceria à classe renomeada *Campylobacteria* (Waite et al., 2017).

Contudo, esta reclassificação taxonômica ainda não foi reconhecida. Por isso, como neste trabalho, o foco principal é o gênero *Arcobacter*, mais propriamente a espécie *Arcobacter butzleri*, a nomenclatura usada será a que neste momento é reconhecida.

### 1.1.2 Principais características do gênero *Arcobacter*

O gênero *Arcobacter* inclui bactérias de Gram negativo, bacilos curvos, podendo incluir células em forma helicoidal ou em forma de S, tendo tamanhos que podem variar entre os 0,2 e 0,5 µm de diâmetro, 0,2 e 0,9 µm de largura e 0,5 e 3,6 µm de comprimento. Esta é uma bactéria não formadora de esporos, todas as espécies apresentam motilidade por meio de um único flagelo polar (monótrico) ou por um flagelo em cada polo (anfítrico) (Ferreira et al., 2017), com exceção de *Arcobacter anaerophilus* que não apresenta flagelo (Jyothsna et al., 2013). Por outro lado, existem espécies de *Arcobacter*, como por exemplo, *Arcobacter molluscorum*, *Arcobacter ellisii*, *Arcobacter suis* e *A. anaerophilus*, que podem apresentar uma morfologia filamentosas, sendo assim distinta das restantes espécies, podendo chegar até aos 7 µm de comprimento (Figueras et al., 2011; Levican et al., 2013; Jyothsna et al., 2013).

As bactérias deste gênero são quimiorganotróficas, não fermentam e nem oxidam hidratos de carbono, mas utilizam aminoácidos e ácidos orgânicos como fontes de carbono (Vandamme et al., 1992). Reduzem o nitrato, hidrolisam o DNA e não produzem H<sub>2</sub>S. Estas bactérias também não hidrolisam a esculina, a gelatina e o amido, e não produzem pigmentos fluorescentes (Vandamme et al., 1992). Por último, a composição em G+C do DNA é de 24.6 a 35 mol% (Vandamme et al., 1992).

Todas as espécies são positivas para o teste de oxidase, mas relativamente ao teste da catalase e da urease estas enzimas estão ausentes em algumas espécies como, por exemplo, *Arcobacter halophilus*, *Arcobacter marinus*, *A. anaerophilus* e *Arcobacter ebronensis* (Ferreira et al., 2017). No entanto, todas as espécies têm ausência das enzimas fosfatase e sulfatase, como também não há produção de indole (Vandamme et al., 1992). As espécies de *Arcobacter* foram descritas como possuírem capacidades diferenciadoras do gênero *Campylobacter*, nomeadamente, a capacidade de crescer em condições aeróbicas e a temperaturas entre os 15 °C e os 30 °C (Vandamme et al., 1992). No entanto, nos dias de hoje e com o aumento do número de espécies de *Arcobacter* este princípio mudou (Ferreira et al., 2016).

Em relação às condições atmosféricas, *Arcobacter* spp. é capaz de crescer sob condições de microaerofilia, tendo capacidade de crescer em condições aeróbicas, com exceção da espécie *A. anaerophilus*, que é um anaeróbio obrigatório (Jyothsna et al., 2013).

Em relação ao pH ótimo para sobrevivência, *Arcobacter* consegue sobreviver a um pH entre

5,5 a 8,0, sendo que o seu crescimento ótimo ocorre a um pH entre os 6,0 e os 7,5, dependendo das espécies e também das estirpes (Faccini dos Santos et al., 2012). Por outro lado, algumas espécies também podem tolerar um pH de 5, quando estão sujeitas a uma temperatura de 37 °C (Lehner et al., 2005) e também a uma temperatura de 25 °C durante 2 dias (Cervenka, 2007).

De entre as espécies do género *Arcobacter*, *A. butzleri* é reconhecido como sendo um patogéneo de origem alimentar e também de origem hídrica. Este género, está distribuído ao longo da cadeia alimentar, podendo ser detetado ou isolado a partir de amostras de água, de alimentos (incluindo alimentos de origem animal) e em instalações de processamento alimentar. Assim, o consumo de alimentos ou água contaminados por *Arcobacter* é considerado uma das principais potenciais vias de transmissão desta bactéria, sendo este um agente patogénico de crescente preocupação pela sua associação a doenças humanas (Ferreira et al., 2017).

## 1.2 Descoberta e características de *Arcobacter butzleri*

As espécies de *Arcobacter* são um grande e diversificado grupo de bactérias, as quais têm sido isoladas a partir de vários ambientes e também de vários hospedeiros (Ferreira et al., 2016). Por outro lado, algumas das espécies de *Arcobacter* estão associadas a doenças em humanos e também a doenças relacionadas com os animais (Ferreira et al., 2016).

Atualmente, existem 30 espécies de *Arcobacter* reconhecidas, como apresentado na tabela 1 (Pérez-Cataluña et al., 2018c ; Callbeck et al., 2019). Realçando-se que nos últimos 10 anos, se verificou um aumento no reconhecimento de novas espécies de *Arcobacter*.

Tabela 1. Espécies de *Arcobacter* propostas e aceites por ano e origem do isolado. Adaptado de: (Hsu & Lee, 2015; Pérez-Cataluña et al., 2018b; Pérez-Cataluña et al., 2018c; Callbeck et al., 2019)

Espécie	Ano	Origem do isolado	Local	Referência
<i>A. cryaerophilus</i>	1977	Fetos Bovinos	Irlanda do Norte	(Ellis et al. 1978)
<i>A. nitrofigilis</i>	1983	Raízes de <i>Spartina alterniflora</i>	USA	(McClung, Patriquin and Davis 1983)
<i>A. butzleri</i>	1991	Amostras de fezes diarreicas	USA	(Kiehlbauch et al. 1991)
<i>A. skirrowii</i>	1992	Fluido prepucial de touros	Bélgica	(Vandamme et al. 1992)
<i>A. cibarius</i>	2005	Carcaças de frango	Bélgica	(Houf et al. 2005)
<i>A. halophilus</i>	2005	Lagoa hipersalina	USA	(Donachie et al. 2005)
<i>A. mytili</i>	2009	Mexilhão e água salobra	Espanha	(Collado et al. 2009)
<i>A. thereius</i>	2009	Porcos e Patos	Bélgica	(Houf et al. 2009)

Tabela 1. Espécies de *Arcobacter* propostas e aceites por ano e origem do isolado. Adaptado dos artigos: (Hsu & Lee, 2015; Pérez-Cataluña et al., 2018b; Pérez-Cataluña et al., 2018c; Callbeck et al., 2019). (continuação).

Espécie	Ano	Origem do isolado	Local	Referência
<i>A. marinus</i>	2011	Água do mar	Coreia	(Kim, Hwang and Cho 2010)
<i>A. trophiarum</i>	2011	Porcos de engorda	Bélgica	(De Smet et al. 2011)
<i>A. defluvii</i>	2011	Águas residuais	Espanha	(Collado et al. 2011)
<i>A. molluscorum</i>	2011	Mariscos	Espanha	(Figueras et al. 2011)
<i>A. ellisii</i>	2011	Mexilhões	Espanha	(Figueras et al. 2011)
<i>A. bivalviorum</i>	2012	Mexilhões e amêijoas	Espanha	(Levicán et al. 2012)
<i>A. venerupis</i>	2012	Mexilhões e amêijoas	Espanha	(Levicán et al. 2012)
<i>A. anaerophilus</i>	2013	Estuário	Índia	(Sasi Jyothsna et al. 2013)
<i>A. cloacae</i>	2013	Esgoto	Espanha	(Levicán, Collado and Figueras 2013)
<i>A. suis</i>	2013	Porco	Espanha	(Levicán, Collado and Figueras 2013)
<i>A. ebronensis</i>	2014	Mexilhões	Espanha	(Levicán et al. 2015)
<i>A. aquimarinus</i>	2014	Água do mar	Espanha	(Levicán et al. 2015)
<i>A. lanthieri</i>	2015	Porco e Estrume	Canadá	(Whiteduck-Léveillé et al. 2015)
<i>A. pacificus</i>	2015	Água do mar	China	(Zhang et al. 2015)
<i>A. lanthieri</i>	2015	Estrume de suínos e bovinos	Canadá	(Whiteduck-Léveillé et al. 2015)
<i>A. faecis</i>	2016	Águas residuais	Canadá	(Whiteduck-Léveillé et al. 2016)
<i>A. acticola</i>	2016	Água do mar	Coreia do Sul	(Park et al. 2016)
<i>A. lekithochrous</i>	2017	Moluscos	Noruega	(Diéguez et al. 2017)
<i>A. canalis</i>	2018	Canais de água	Espanha	(Pérez-Cataluña et al., 2018b)
<i>A. caeni</i>	2018	Água	Espanha	(Pérez-Cataluña et al., 2018c)
<i>A. lacus</i>	2018	Água	Espanha	(Pérez-Cataluña et al., 2018c)
<i>A. peruensis</i>	2019	Água costeiras e sulfúricas	Peru	(Callbeck et al., 2019)

### 1.2.1. *Arcobacter butzleri*

Entre as espécies reconhecidas, *A. butzleri* foi descrita no ano de 1991 por Kiehlbauch e seus colaboradores (Kiehlbauch et al., 1991). Esta espécie tem recebido uma maior atenção, pois é um patógeno emergente com distribuição global, sendo considerado um risco sério para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002) e é também considerado como um potencial agente causador de surtos transmitidos por alimentos (Lappi et al., 2013). Para além disto, esta espécie é descrita como a quarta espécie mais prevalente encontrada em amostras diarreicas humanas de entre os *Campylobacter-like organisms* (Vandamme et al., 1992).

*A. butzleri* foi isolado pela primeira vez a partir de fetos e de placentas de origem bovina, suína e ovina (Vandamme et al., 1992). *A. butzleri* tem sido associado a doenças em humanos e a doenças em animais descritas em diversos continentes, como por exemplo, a Europa e a América (Ferreira et al., 2017). Em humanos, *A. butzleri* está associado a casos de enterite, a doenças gastrointestinais e ocasionalmente a bacteremia. Em animais, está associada a doenças como abortos, mastites ou diarreia (Ferreira et al., 2016).

*A. butzleri* pode crescer a uma temperatura entre 20 °C e 37 °C, em condições microaeróbicas a 37 °C, crescem em meio *MacConkey* e apresenta um bom crescimento em meio agarizado com sangue. Não oxida nem fermenta a D-glucose. Pode crescer em meio contendo 1 % de glicina e em meio contendo 8 % de glucose com succinato de sódio. Também apresenta crescimento variável na presença de 1,5 % e 3,5 % de NaCl (Faccini dos Santos et al., 2012). Esta bactéria apresenta resistência à cefoperazona (64 mg/mL) (Ferreira et al., 2017). Quanto à atividade das enzimas, *Arcobacter butzleri*, é positivo para o teste da catalase, é variável para o teste da urease, apresenta capacidade de reduzir o nitrato, de hidrolisar o acetato indoxil e não produz H<sub>2</sub>S (sulfato de hidrogénio) (Ferreira et al., 2017).

## 1.3 Distribuição de *Arcobacter butzleri*

Considerando que algumas das espécies de *Arcobacter* são patogénicas, a sua presença deve ser examinada em todas as etapas da cadeia alimentar para se entender melhor a sua distribuição e possivelmente prever que o consumo de alimentos e o consumo de água possa ser uma via de transmissão (Figura 1). Esta avaliação deve ser realizada desde a produção primária até ao fornecimento dos alimentos para o consumidor (Ferreira et al., 2016).

Como *A. butzleri* se encontra disperso por toda a cadeia alimentar, pode apontar-se para um potencial problema de saúde pública devido ao consumo de alimentos e água contaminados.

Isto é, fortalecido pela capacidade deste microrganismo sobreviver em alimentos e água e pela sua resistência ao stress criado durante a alimentação, armazenamento e processamento (Ferreira et al., 2019).

A espécie de *A. butzleri* está presente em diversos habitats, sendo a espécie mais comum isolada de humanos e também isolada da maioria dos alimentos (Ferreira et al., 2017).

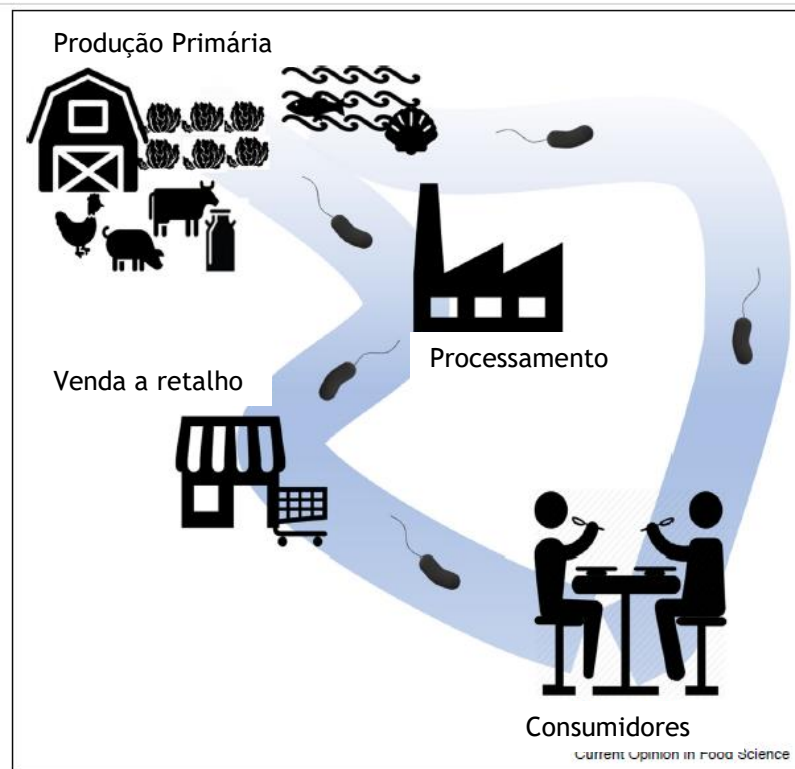


Figura 1. Visão esquemática da distribuição de *Arcobacter* na cadeia alimentar. Adaptado de (Ferreira et al., 2019).

### 1.3.1 Isolamento de *Arcobacter butzleri* a partir de água

*A. butzleri* é encontrado em ambientes naturais como solos e águas (tanto na água doce como na água salgada) ou também em outros locais como por exemplo, estações de tratamento de águas residuais (Levican et al., 2016). Esta bactéria tem sido detetada em diferentes tipos de amostras de água como, por exemplo, água do mar, águas provenientes de estuários, águas de rios, lagos e de nascente, e também de águas subterrâneas (canais, esgotos, lodo) (Tabela 2) (Moreno et al., 2003; Collado et al., 2008). Por sua vez, esta bactéria, também foi detetada na água potável (Ferreira et al., 2017), ou seja, água para consumo humano, como por exemplo, a água da torneira (Hsu & Lee, 2015).

Tabela 2. Distribuição global de *Arcobacter butzleri* em vários tipos de água. Adaptado de (Hsu & Lee, 2015; Ferreira et al., 2019)

Origem	Região	Referência
Esgotos	Reino Unido	Merga et al. (2014)
Águas Residuais	Espanha	González et al. (2007)
Água do mar	Espanha	Collado et al. (2008)
Lodo	Espanha	Collado et al. (2008)
Lagos	Espanha	Moreno et al. (2013)
Rios	Espanha	Collado et al. (2010)
Água superficial	África do Sul	Diergaardt et al. (2004)
Água de nascente	Turquia	Ertas et al. (2010)
Água subterrânea	USA	Rice et al. (1999)
Água da praia	USA	Lee et al. (2012)

### 1.3.2 Isolamento de *Arcobacter butzleri* em fábricas de processamento de alimentos

Em relação à presença de agentes patogénicos em fábricas de processamento de alimentos muitas pesquisas foram feitas. Estas foram feitas em produtos alimentícios na fase de processamento e também em produtos prontos para consumo e demonstraram que há uma ampla distribuição de *A. butzleri* em toda a cadeia alimentar (Tabela 3) (Hsu & Lee, 2015). Diversos estudos demonstraram a deteção desta espécie em fábricas de processamento de alimentos (Ferreira et al., 2017), como por exemplo, em matadouros de aves de capoeira, como peru (Andersen et al., 2007) e frango (Amare et al., 2011), matadouros de bovinos ou caprinos (Shah et al., 2013), de queijarias (Giacometti et al., 2013) ou de fábricas de processamento de espinafres (Hausdorf et al., 2013).

Tabela 3. Distribuição global de *Arcobacter butzleri* em várias fábricas de processamento de alimentos. Adaptado de (Hsu & Lee, 2015; Ferreira et al., 2019)

Categoria	Fonte	Região	Referência
Aves de Capoeira	Linhas de processamento de frangos	Dinamarca	Rasmussen et al. (2013)
Carne	Gado bovino e caprino	Malásia	(Shah et al., 2013)
	Fábrica de queijo	Itália	(Giacometti et al., 2013)
Laticínios	Linha de produção	Itália	Serraino e Giacometti (2014)
	Filtros de leite	Itália	Serraino et al. (2013)
	Queijo durante a maturação	Portugal	Ferreira et al. (2017)
Espinafres	Fábrica de processamento do espinafre	Alemanha	(Hausdorf et al., 2013)

### 1.3.3 Isolamento de *Arcobacter butzleri* a partir de alimentos

Como já foi referido, *A. butzleri* também pode ser detetado em vários alimentos (Tabela 4), como por exemplo, marisco, camarão e mexilhões (Collado et al., 2009), sendo que esta espécie foi encontrada com alta frequência em alimentos do mar (Ferreira et al., 2019). Esta espécie também foi detetada em vários tipos de carne como por exemplo, a carne de aves domésticas, como em frango (Andersen et al., 2007), peru (Amare et al., 2011) ou pato (Bogantes et al., 2015), mas também noutros tipos de carne, como a carne de porco (Ellen Van Driessche et al., 2004) e a carne de vaca (Wesley et al., 2000).

Por sua vez, a espécie *A. butzleri* pode ser detetada em vários tipos de vegetais, sendo este facto visto como um risco considerável para a saúde humana, pois a maioria dos vegetais são consumidos crus, o que pode ser uma via potencial de transmissão deste patógeno (Ferreira et al., 2016).

Tabela 4. Distribuição global de *Arcobacter butzleri* em alimentos. Adaptado de (Hsu & Lee, 2015; Ferreira et al., 2019)

Categoria	Fonte	Região	Prevalência (%), n= amostra total	Referência
	Aves de capoeira	Reino Unido	62, n= 94	Sculion et al. (2006)
			64,3, n= 14	
		Espanha,	73, n= 22	Collado et al. (2009), Rivas et
	Carne de frango	Austrália, Irão e	31, n= 100	al. (2004), Rahimi
		Brasil	18,3, n= 55/300	(2014), Oliveira et
			( <i>A. butzleri</i>	al. (2018)
			(63,6%, 35/55))	
	Frango	Coreia do Sul	21,1, n= 360	Lee et al. (2010)
			75,6, n= 93/123	
Aves de capoeira	Frango fresco	Coreia do Sul	( <i>A. butzleri</i>	Kim et al. (2019)
			(98,9%, 92/93))	
			5, n= 1/20 ( <i>A.</i>	
	Frango congelado	Coreia do Sul	<i>butzleri</i> (100%,	Kim et al. (2019)
			1/1))	
			53,3, n= 8/15 ( <i>A.</i>	
	Amostras de aves	Itália	<i>butzleri</i> (100%,	Di noto et al. (2018)
			8/8))	
			40, n= 5	Collado et al.
	Carne de pato	Espanha e Irão	28, n= 50	(2009), Rahimi
				(2014)

Tabela 4. Distribuição global de *Arcobacter butzleri* em alimentos. Adaptado de (Hsu & Lee, 2015; Ferreira et al., 2019). (continuação)

Categoria	Fonte	Região	Prevalência (%), n= amostra total	Referência
Aves de capoeira	Carne de ganso	Irão	10, n= 50	Rahimi (2014)
	Carne de perdiz	Irão	11,3, n= 80	Rahimi (2014)
	Carne de avestruz	Irão	3,3, n= 60	Rahimi (2014)
Carne bovina	Carne bovina	Reino Unido, República Checa, Austrália e Itália	34, n=108	Scullion et al. (2006), Pejchalová et al. (2008), Rivas et al. (2004), Di noto et al. (2018)
			38,4, n= 13	
			22, n=32	
			7,7, n= 2/26 (A. <i>butzleri</i> (100%, 2/2))	
Carne bovina	Carne bovina importada	Malásia	46,8, n= 22	Shah et al. (2012)
	Carne bovina processada no local	Malásia	16,9, n= 59	Shah et al. (2012)
	Amostras de carne bovina picada	Turquia	6,7, n= 3/45 (A. <i>butzleri</i> (66,7%, 2/3))	Elmalii (2016)
Laticínios	Leite cru	Reino Unido, Malásia	46, n=101	Scullion et al. (2006), Shah et al. (2012)
			5,8, n=56	
	Leite cru de vaca	Turquia	23,9, n= 11/46 (A. <i>butzleri</i> (45,4%, 5/11))	Elmalii (2016)
	Leite cru de ovelha	Portugal	52,4, n= 22/42 (A. <i>butzleri</i> (90,9%, 20/22))	Ferreira et al. (2017)
Alimentos do mar	Soro do leite	Portugal	52,4, n= 22/42 (A. <i>butzleri</i> (90,9%, 20/22))	Ferreira et al. (2017)
	Mexilhões	Espanha	41,1, n= 56	Collado et al. (2009)
	Ameijoas	Espanha	100, n= 5	Collado et al. (2009)
	Marisco	Espanha e Índia	78,3, n= 23 37,5, n= 54/144 (A. <i>butzleri</i> (95,2%, 40/42))	Salas-Massó et al. (2018), Laishram et al. (2016)

Tabela 4. Distribuição global de *Arcobacter butzleri* em alimentos. Adaptado de (Hsu & Lee, 2015; Ferreira et al., 2019). (continuação)

Categoria	Fonte	Região	Prevalência (%), n= amostra total	Referência
Alimentos do mar	Bivalves	Itália	47,6, n= 10/21 ( <i>A. butzleri</i> (66,7%, 4/6))	Di noto et al. (2018), Leoni et al. (2017), Mottola et al. (2016), Ottaviani et al. (2017)
	Peixe	India e Portugal	37,5, n= 54/144 ( <i>A. butzleri</i> (95,2%, 40/42)) 68, n= 17/25 ( <i>A. butzleri</i> (35,7, 5/14))	Laishram et al. (2016), Vicente-Martins et al. (2018)
Porco	Carne de porco	Reino Unido, Espanha, Austrália, Coreia do Sul, Portugal e Brasil	35, n= 101 53, n= 17 29, n= 21 55,6, n= 50/90 ( <i>A. butzleri</i> (52%, 26/50)) 45,8, n= 11/24 ( <i>A. butzleri</i> (55,6%, 5/9))	Scullion et al. (2006), Collado et al. (2009), Rivas et al. 2004, Kim et al. (2019), Vicente-Martins et al. (2018), Gobbi et al. (2018)
	Carcaças de suínos	Brasil	10, n= 2/20 ( <i>A. butzleri</i> (100%, 2/2)) 38,5, n= 77/200 ( <i>A. butzleri</i> (56,4%, 114/202))	Gobbi et al. (2018)
Cordeiro	Carne de cordeiro	República Checa e Austrália	28,2 n=39 15, n= 13	Pejchalov_a et al. (2008), Rivas et al. (2004)
Coelho	Carne de coelho	Espanha	10, n= 10 14, n= 50	Collado et al. (2009b)
Vegetais	Alface	Espanha e Coreia do Sul, Turquia	4,4 n= 4/90 ( <i>A. butzleri</i> (100%, 4/4)) 21, n= 21/100 ( <i>A. butzleri</i> (52,9% 9/17))	González and Ferrús (2011), González et al. (2017), Kim et al. (2019)

Tabela 4. Distribuição global de *Arcobacter butzleri* em alimentos. Adaptado de (Hsu & Lee, 2015; Ferreira et al., 2019). (continuação)

Categoria	Fonte	Região	Prevalência (%), n= amostra total	Referência	
Vegetais	Alho Francês	Coreia do Sul e Espanha	14, n= 50	Kim et al. (2019), González et al. (2017)	
			4,4 n= 4/90 (A. <i>butzleri</i> (100%, 4/4))		
	21, n= 21/100 (A. <i>butzleri</i> (52,9% 9/17))				
	14, n= 50				
	Espinafres	Coreia do Sul e Espanha	4,4 n= 4/90 (A. <i>butzleri</i> (100%, 4/4))	Kim et al. (2019), González et al. (2017)	
			21, n= 21/100 (A. <i>butzleri</i> (52,9% 9/17))		
	Salsa	Coreia do Sul	14, n= 50		Kim et al. (2019)
			4,4 n= 4/90 (A. <i>butzleri</i> (100%, 4/4))		
Acelga	Espanha	21, n= 21/100 (A. <i>butzleri</i> (52,9% 9/17))	González et al. (2017)		
		47,6, n= 10/21 (A. <i>butzleri</i> (66,7%, 4/6))			
Vegetais prontos para comer	Portugal e Itália	27,5, n= 44/160 (A. <i>butzleri</i> (90,9%, 40/44))		Vicente-Martins et al. (2018), Mottola et al. (2016)	

## 1.4 Sobrevivência de *Arcobacter butzleri* em condições de stress associadas ao setor alimentar

A capacidade de *A. butzleri* persistir e sobreviver em alimentos e ambientes de processamento, bem como a sobrevivência sob condições de armazenamento, processamento e higienização ainda são pouco estudadas e requerem análises para avaliar a verdadeira resistência de *A. butzleri* em matrizes alimentares.

Considerando que *A. butzleri* está associado a doenças em humanos e também a doenças de origem animal, e dado que esta bactéria tem sido detetada e é prevalente em alimentos e em água, vários estudos têm sido apresentados sobre a capacidade de sobrevivência deste microrganismo e também acerca de novos tratamentos para o controlar e eliminar. A sobrevivência e inativação de *Arcobacter spp.* foi previamente revisto com base em tratamentos físicos e químicos e desde então, nos últimos anos, vários trabalhos se debruçaram sobre este tema (Cervenka, 2007).

Diversos estudos indicam que *A. butzleri* pode sobreviver em alimentos, como carne de porco moída (D'Sa & Harrison, 2005), líquido de escorrimento de frango (Kjeldgaard et al., 2009), carne comercial embalada a vácuo (Balamurugan et al., 2013) ou leite e queijo (Serraino & Giacometti, 2014) em condições de armazenamento.

Assim, esta espécie, *A. butzleri* no ambiente e na cadeia alimentar é sujeita a várias condições de stress, como por exemplo, o stress térmico (tratamento físico), o stress ácido e o stress químico (tratamento químico).

#### 1.4.1 Stress térmico

*Arcobacter spp.* tem uma ampla gama de temperaturas na qual o seu crescimento foi observado. Para uma estirpe humana de *A. butzleri* foi relatado crescimento numa gama de temperatura entre 15 e 37 °C, com a taxa de crescimento específica de 0,57 h<sup>-1</sup> a 30 °C (Hilton et al., 2001). Vandamme e os seus colaboradores fizeram um estudo, onde não houve crescimento detetável a 40 °C (Vandamme et al., 1992), mas por outro lado, também foi relatado crescimento de *A. butzleri* isolado de um paciente com cirrose hepática a 42 °C (Yan et al., 2000).

Muitos estudos existem em relação ao efeito de temperaturas usadas no sector alimentar sobre *Arcobacter spp.*. As temperaturas ideais de armazenamento (6 e 12 °C) serviram para observar a capacidade de sobrevivência ou até o crescimento por *A. butzleri* em queijarias. De facto, à temperatura de 6 °C observou-se uma redução significativa nas contagens de unidades formadoras de colónias (UFC) de *A. butzleri*, enquanto que à temperatura de 12 °C observou-se um aumento nas contagens de UFC de *A. butzleri* (Giacometti et al., 2015). Também em alimentos de origem vegetal foi avaliada a sobrevivência desta bactéria, Lee e os seus colaboradores avaliaram a capacidade de sobrevivência de *A. butzleri* quando inoculado em puré de maçã e pera, isto mostrou que o número de colónias de *A. butzleri* diminuiu significativamente durante o armazenamento a 4 °C ou a 20 °C (Lee & Choi, 2013).

D'Sa & Harrison apresentaram um estudo que teve como objetivo determinar a capacidade de crescimento e a sobrevivência de várias espécies de *Arcobacter*, como *A. butzleri* e *A.*

*cryaerophilus* quando sujeitas a altas temperaturas e visualizar qual o efeito da temperatura na sobrevivência e crescimento destas três espécies de *Arcobacter* (D'Sa & Harrison, 2005). Assim, os autores testaram três estirpes de *A. butzleri* sujeitando-as a três temperaturas, isto é, a 60, 55 e 50 °C, a um pH de 5,5 e de 7,3. Quando se fez este estudo observou-se, que a combinação da temperatura com o pH a 5,5 provocou uma diminuição nos valores de D (tempos de redução decimal). Também, a partir deste estudo, constataram que *Arcobacter* é mais termoresistente em relação a *Campylobacter*. Por outro lado, o calor seguido de um choque térmico, isto é, aplicação de um choque térmico leve de 50 °C durante 30 segundos a 1 minuto e de seguida um tratamento a frio a várias temperaturas, como, 4, 8, 12 e 16 °C, provocou uma grande redução no número de células, sendo que isto pode ser explicado por danos na membrana celular devido à temperatura. Para uma das estirpes testadas neste estudo, a redução foi de 26 - 50 % e para outra estirpe de *A. butzleri* foi de 21 - 66 %. Concluindo que, o tempo de redução decimal para a mistura das três estirpes de *A. butzleri* foi de 18,51 minutos para a temperatura de 50 °C e de 2,18 minutos para a temperatura de 55 °C (D'Sa & Harrison, 2005).

Ho e seus colaboradros estudaram a sobrevivência de *A. butzleri* em condições de escaldamento (52 °C e 58 °C), este trabalho teve como objetivo determinar a fonte de contaminação por *Arcobacter* em dois matadouros de aves na Holanda e como tal teve-se de avaliar a capacidade de sobrevivência de dois isolados de *A. butzleri* ao sobreviver às condições de escaldamento, como indica a tabela 5 (Ho et al., 2008).

Tabela 5. Ensaio de sobrevivência de isolados de *Arcobacter butzleri* em condições de escaldamento (Ho et al., 2008)

Estirpes de <i>A. butzleri</i>	Log UFC/mL 52 °C a 3 minutos		Log UFC/mL 58 °C a 3 minutos	
	Inóculo	Sobrevivência	Inóculo	Sobrevivência
	6,5	5,6	6,6	3,9
<i>A. butzleri</i> K21c	5,6	4,2	5,6	2,8
	4,6	1,9	4,6	Não detetado
<i>A. butzleri</i>	6,1	4,3	6,8	
K429a	5,8	2,2	5,8	Não detetado
	4,8	1,8	4,8	

Assim, como se observa na tabela 5, após a exposição a 52 °C durante 3 minutos, o número de bactérias foi reduzido em 0,9 a 3 log UFC/mL, enquanto que a exposição a 58 °C durante 3 minutos, levou a uma redução no número de bactérias em pelo menos 2,7 log UFC/mL. Contudo, isto indica que em condições de escaldamento há diminuição do número de células, mas os tratamentos podem não ser suficientes para eliminar as bactérias dos alimentos (Ho et

al., 2008).

Quanto ao tratamento físico, como são os tratamentos térmicos, estes podem promover perturbações na membrana externa, tanto a baixas temperaturas como a altas temperaturas (Prudêncio et al., 2015). Driessche e Houf (2008) apresentaram um estudo em que se avaliou a sobrevivência de três espécies (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowi*) em água e em água com 1% de material orgânico, a temperaturas de 4 °C e 7 °C, à temperatura ambiente (20 °C) e a temperaturas de escaldamento (52°C, 56°C e 60°C). Todas as espécies de *Arcobacter* permaneceram viáveis por um período dependente de temperatura, mas *A. butzleri* exibiu uma sobrevivência significativamente mais longa e também exibiu maior resistência ao calor. O período de sobrevivência para todas as espécies de *Arcobacter* foi maior na presença de material orgânico em temperaturas baixas. As três espécies de *Arcobacter* permaneceram viáveis por um período dependente da temperatura, todas as espécies sobreviveram pelo menos 21 dias em temperaturas de 4 °C e 7 °C. À temperatura ambiente estas espécies mantiveram-se viáveis e em ótimo crescimento, e quando foram incubadas a temperaturas de escaldamento, estas espécies ainda sobreviveram por vários minutos (Ho et al., 2008). Este estudo comprova que *A. butzleri* tem uma maior capacidade de sobrevivência que as outras duas espécies, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowi* para todas as temperaturas testadas. Contudo a sobrevivência de *A. butzleri* poderá ser prolongada pela incorporação de material orgânico em água nas temperaturas de escaldamento (52, 56 e 60 °C), à temperatura ambiente (20 °C) e também pela incubação a baixas temperaturas (entre 4 e 7 °C). Portanto, a redução da contaminação foi observada pelo uso da temperatura, mas esses tratamentos, podem não ser suficientes para eliminar as bactérias dos alimentos (Driessche & Houf, 2008). Assim, quando se consideram os alimentos, vários fatores podem estar por trás da resistência de *A. butzleri*, como por exemplo, a microflora presente. Balamurugan e seus colaboradores mostraram que a microflora de vários tipos de carnes contribui também para a sobrevivência de *A. butzleri* (Balamurugan et al., 2013).

Isohanni e os seus colaboradores realizaram um estudo que teve como objetivo a exposição de estirpes de *A. butzleri* à temperatura de 48 °C e também à temperatura de 10 °C. Quanto à sobrevivência de *A. butzleri* quando exposta a uma temperatura de 48 °C, as contagens de UFC de *A. butzleri* após 2 horas diminuíram moderadamente, enquanto que ao fim de 24 horas as contagens diminuíram para números indetetáveis. Em relação à sobrevivência de *A. butzleri* quando exposto a uma temperatura de 10 °C, as contagens de UFC de *A. butzleri* diminuíram moderadamente após 24 horas de exposição (Isohanni et al., 2013).

Assim, existem estudos que apontam que a sobrevivência da espécie *A. butzleri* a condições de altas temperaturas, pode levar a contaminações ao nível do processamento dos alimentos que servem para consumo humano (Ho et al., 2008). Porém, o processo de refrigeração pode reduzir a sobrevivência de *A. butzleri*, não sendo esta a temperatura ideal de crescimento desta espécie (Ferreira et al., 2016). Ainda segundo a literatura, afirma-se que *A. butzleri*

sobrevive melhor em condições de refrigeração em relação às condições de congelamento (Cervenka, 2008).

A presença de *Arcobacter* na água e a capacidade de as bactérias crescerem a baixas temperaturas e sobreviverem em ambientes com escassez de nutrientes sustentam ainda mais o seu potencial como um agente patogénico de origem hídrica (Ferreira et al., 2016).

#### 1.4.2 Stress ácido

Quanto ao tratamento ácido alguns autores têm estudado a influência deste tipo de stress na sobrevivência de *Arcobacter* spp.. Skrivanová e seus colaboradores apresentaram um estudo onde utilizaram 17 ácidos orgânicos para inibir espécies de *Arcobacter* (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*) em frango. Estes 17 ácidos orgânicos demonstraram a capacidade de suprimir a proliferação bacteriana, não causando alterações na aparência e no odor do alimento. A conclusão deste estudo foi que o ácido benzóico, cítrico, málico e ascórbico revelaram as maiores atividades inibitórias, sendo que o ácido benzóico pela análise sensorial revelou ser o ácido orgânico mais adequado no tratamento da carne de frango (Skrivanová et al., 2011). A descontaminação de carne por ácidos orgânicos foi aprovada nos Estados Unidos da América pelo “*The Food Safety and Inspection Service of the U.S.*”. Considerando estudos anteriores que foram feitos, o uso de ácidos orgânicos pode ser visto como um método adequado para a redução de *Arcobacter* spp. nos alimentos, ou seja, o uso de ácidos orgânicos pode ser um método promissor para processos de descontaminação de alimentos, porque as práticas de processamento alimentar, de higienização e os programas de HACCP (do inglês *Hazard Analysis and Critical Control Point* - Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos) na indústria são muitas vezes insuficientes para impedir a presença ou inibir o crescimento de microrganismos (Skrivanová et al., 2011). Contudo, os ácidos orgânicos apresentam vantagens e limitações em relação à sua utilização. As vantagens dos ácidos orgânicos passam por ser de fácil manuseamento e não apresentarem toxicidade. Em relação às suas limitações, eles precisam de um longo tempo de contacto o que não é adequado para a indústria, podem interferir com a qualidade sensorial dos produtos e têm menor eficácia antimicrobiana (Olmez & Kretzschmar, 2009). No entanto, foi feito um estudo para avaliar o efeito dos ácidos orgânicos e o efeito do pH em *Arcobacter butzleri* e como se pode verificar na tabela 6, estes são eficazes na sua inibição (Cervenka et al., 2003). De facto, a inibição do crescimento de bactérias deve-se não só ao baixo pH, mas também às propriedades antimicrobianas das moléculas dos ácidos orgânicos (Cervenka et al., 2003).

Tabela 6. Crescimento de *Arcobacter butzleri* em diferentes valores de pH e diferentes ácidos orgânicos (Cervenka et al., 2003)

Espécie	pH	Ácidos Orgânicos						
		Fórmico	Propiónico	Láctico	Ascórbico	Málico	Tartárico	Cítrico
<i>Arcobacter butzleri</i>	4,5	-	-	-	-	-	-	-
	5,0	-	-	-	-	-	-	-
	5,5	-	+	+	+	+	-	-
	6,0	+	+	+	+	+	+	+
	6,5	+	+	+	+	+	+	+

Nota: (+) houve crescimento de *Arcobacter butzleri*; (-) houve inibição do crescimento de *Arcobacter butzleri*.

Como já foi referido anteriormente, alguns autores constataram que o pH tem um papel fundamental neste tipo de tratamento. *Arcobacter butzleri*, é geralmente conhecido como sendo um microrganismo que sobrevive a baixos valores de pH, pois estes baixos valores de pH podem inibir o crescimento das bactérias (Cervenka, 2008).

Tendo em conta o efeito do pH no crescimento ou sobrevivência de *Arcobacter* spp., diversos estudos foram realizados. Lee e os seus colaboradores fizeram um estudo de avaliação da sobrevivência de *A. butzleri* quando inoculado em puré de maçã e pera, e constataram que o pH ácido, alto teor de açúcar, atividade de água e os polifenóis nos purés podem contribuir para a redução da população desta bactéria (Lee & Choi, 2013). Isohanni e os seus colaboradores analisaram o efeito da exposição de estirpes de *A. butzleri* a um pH de 5 e a um pH de 4, verificando que quando *A. butzleri* foi exposto a um pH de 4, as contagens de *A. butzleri* passaram a indetectáveis ao fim de 1 hora (Isohanni et al., 2013).

Neste contexto, a sobrevivência das bactérias depende não apenas do valor do pH, mas também do tipo de ácido utilizado, pois alguns ácidos são mais eficazes contra *A. butzleri*, embora o pH seja o mesmo (Cervenka et al., 2003; Cervenka, 2007). Contudo, o pH funciona como uma restrição importante para a distribuição e sobrevivência de *Arcobacter* spp. no ambiente, particularmente em alimentos e produtos alimentares.

### 1.4.3 Stress químico

De entre os diversos stresses químicos a que *Arcobacter* spp. pode estar sujeito, a desinfecção com cloro é um dos mais relevantes, dado que este biocida pode ser usado no processo de desinfecção de superfícies, mas também de águas ou alimentos.

As espécies de *Arcobacter* são frequentemente isoladas de várias amostras de água, sendo que alguns estudos foram feitos para estudarem a eficácia nos tratamentos de água, ou seja, a cloração. Assim, Rice et al. 1999, estudaram a inativação de *A. butzleri* por cloro em água de poço, e constataram que *A. butzleri* diminuiu 0,5 log UFC/mL durante um período de 16 dias a 5 °C (Rice et al., 1999). Com este tratamento, observou-se que houve danos na membrana das células bacterianas e depois mais tarde veio ser comprovado por Moreno e os seus colaboradores (Moreno et al., 2003).

No entanto, também um estudo foi feito por Collado e seus colaboradores, onde estudaram o isolamento de *Arcobacter spp.* de águas tratadas com cloro e constataram que não houve detecção de *Arcobacter*. No entanto, estes autores, demonstraram que o tratamento de água (cloração) é eficaz na eliminação de espécies de *Arcobacter* (Collado et al., 2010). Por isso, pode-se concluir que a cloração é necessária para estabelecer uma barreira à disseminação de agentes infecciosos, como por exemplo, através de uma fonte de água contaminada (Ferreira et al., 2016).

Rasmussen e os seus colaboradores apresentaram um trabalho onde testaram a tolerância de *A. butzleri* ao hipoclorito de sódio, apresentando uma concentração mínima inibitória (CMI) de 0,5 % correspondente a 500 ppm de cloreto ativo, para 31 de 32 isolados testados, sendo esta a concentração de trabalho máxima recomendada para este biocida. Os autores demonstraram também que uma menor concentração de trabalho de hipoclorito de sódio (0,2 %) não teve efeito letal sobre *A. butzleri* mesmo após 20 h de exposição. Assim, considerando o tempo de contato de desinfecção de 10 min, é provável que *A. butzleri* possa sobreviver a processos de higienização (Rasmussen et al., 2013).

Outro estudo realizado por Serraino e Giacometti avaliou a presença de *Arcobacter spp.* em superfícies em contacto e que não estão em contacto com os alimentos, em fábricas de laticínios (Serraino & Giacometti, 2014). Assim, estes autores através da avaliação das superfícies em contacto com os alimentos, não conseguiram determinar a fonte primária de contaminação antes e durante o fabrico de queijos, tendo excluído a contaminação por leite pasteurizado e água. Contudo, foi feito um estudo anterior que identificou que a contaminação em fábricas de laticínios era através de leite cru (Giacometti et al., 2013). Por outro lado, estes autores também avaliaram a eficácia dos processos de higienização nesta indústria na eliminação de *Arcobacter*. Os resultados deste estudo permitem especular que a contaminação por *A. butzleri* pode ocorrer a partir de uma grande variedade de fontes na fábrica de laticínios, contudo a limpeza e o saneamento manual não removem efetivamente este microrganismo (Giacometti et al., 2013). No entanto, mas mais estudos são necessários para determinar se certas espécies de *Arcobacter* persistem e podem sobreviver por longos períodos em fábricas de laticínios ao fim dos procedimentos de higienização que são feitas nas superfícies que contactam com os alimentos (Serraino & Giacometti, 2014).

Quanto ao tratamento químico, muitos estudos têm vindo a ser feitos para avaliar processos de desinfecção de vegetais, no entanto, esta abordagem ainda não foi tida com *Arcobacter* spp. apesar da sua prevalência neste tipo de alimentos. Por exemplo, Silveira e seus colaboradores analisaram cinco indústrias de vegetais no processo de lavagem e desinfecção na eliminação de *Salmonella enteritidis* e constataram que a utilização de 200 mg/L de hipoclorito de sódio na lavagem de alface foi eficaz na eliminação desta espécie (Silveira et al., 2017). Contudo, é possível apresentar vantagens e desvantagens na utilização de hipoclorito de sódio. Assim, este composto apresenta baixo custo, fácil manuseamento e aquisição; podendo, no entanto, formar subprodutos de desinfecção perigosos em níveis elevados, reage com matéria orgânica, a sua eficácia é afetada pela presença de matéria orgânica e em último, a sua atividade é dependente do pH (Olmez & Kretzschmar, 2009).

A AMUKINA é um líquido desinfetante à base de hipoclorito de sódio que possui propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas sobre os microrganismos patogénicos de frutas e legumes, este produto pode ser usado para a desinfecção de alimentos, nomeadamente de vegetais para consumo crus. Um estudo avaliou a aplicação de uma concentração de 5 % de AMUKINA em diferentes tipos de microrganismos numa suspensão, e avaliou quanto tempo os microrganismos devem estar expostos à AMUKINA para serem eliminados (Tabela 7) (Ferreira, 2009). Este estudo demonstrou que a aplicação deste composto nesta concentração, permitia a eliminação das bactérias em estudo após um período que iria dos 30 segundos aos 15 minutos. No entanto, ainda nada se sabe da ação da AMUKINA em *A. butzleri* e nem qual o tempo a utilizar para a eliminação deste microrganismo.

Tabela 7. Tempo necessário para a eliminação de diferentes microrganismos quando sujeitos à AMUKINA a 5 %. Adaptado de (Ferreira, 2009)

Microrganismos	30 segundos	1 minuto	5 minutos	15 minutos
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
<i>Proteus vulgaris</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
<i>Mycobacterium smegmatis</i>				
<i>Candida albicans</i>				
Vírus Herpes Simplex				
Poliovírus				
HIV-1				
Vírus da Hepatite A				
Vírus da Hepatite B				
Vírus da hepatite C				
<i>Salmonella Typhi</i>				

Nota: o sombreado na tabela indica o tempo a que os vários microrganismos demoram a serem eliminados completamente.

Assim, a desinfecção química com produtos à base de cloro é atualmente uma relevante barreira existente e colocada em prática em várias indústrias para a prevenção da transmissão de doenças de origem alimentar transmitidas pelos alimentos consumidos crus (Ferreira, 2009).

A capacidade de sobrevivência e a resistência de *Arcobacter* aos procedimentos de desinfecção reforçam o pré-requisito para práticas de higienização rigorosas, implementação e validação das tecnologias de descontaminação e avaliação da eficácia dos tratamentos de controle para garantir a segurança relativa a *Arcobacter spp.* na cadeia alimentar (Silveira et al., 2017). Contudo, ainda há muita coisa por estudar em relação à sobrevivência de *A. butzleri* no que diz respeito à higienização dos alimentos, sendo que a desinfecção química com produtos à base de cloro é atualmente a única barreira existente e colocada em prática (Ferreira, 2009).

Assim sendo, estes ensaios de stress (térmico, ácido e químico) servem para se perceber se as estirpes de *A. butzleri*, sobrevivem e são resistentes ou não às condições extremas de stress a que podem estar sujeitas pelo meio ambiente ou pela cadeia alimentar onde possam estar inseridas.



## Capítulo 2: Objetivos

Nos dias de hoje, sabe-se que *A. butzleri* é vastamente encontrado na cadeia alimentar, tanto em alimentos, como ambientes de processamento alimentar ou águas de consumo humano. Este microrganismo é considerado um patógeno emergente, sendo um perigo para a saúde humana, no entanto ainda pouco se sabe acerca dele, nomeadamente acerca da sua capacidade de sobrevivência e persistência em alimentos. Assim, são necessários mais estudos que analisem a sobrevivência de *A. butzleri* a condições de stress associadas ao processamento alimentar, mas também associadas às condições de higienização considerando não só o processo na ausência como na presença de matrizes alimentares.

Assim, o objetivo global deste trabalho passou por avaliar a sobrevivência de *A. butzleri* na ausência e na presença de matrizes alimentares, quando sujeito a condições de stress.

Para tal definiram-se como objetivos específicos:

- Avaliar a ação da temperatura de 55 °C, vinagre e AMUKINA na sobrevivência de *A. butzleri* numa suspensão;
- Avaliar a ação da temperatura de 55 °C na sobrevivência de *A. butzleri* em carne de frango;
- Avaliar a ação do vinagre e da AMUKINA na sobrevivência de *A. butzleri* na alface “iceberg”.



## Capítulo 3: Materiais e Métodos

### 3.1 Microrganismos usados neste estudo

Para a realização deste trabalho laboratorial foram utilizadas seis estirpes de *Arcobacter butzleri*, provenientes de vários alimentos e também de humanos, como está descrito na tabela 8.

Tabela 8. Origem das estirpes utilizadas no trabalho laboratorial

Estirpe	Origem	Referência
A6-1	Água	(Ferreira et al., 2018)
AB28/11	Pele de pescoço de carcaça de frango (matadouro)	(Ferreira et al., 2013)
CR21-1	Vegetais prontos para consumo (comércio a retalho)	(Vicente-Martins et al., 2018)
CR42-4	Carne de aves (comércio a retalho)	(Vicente-Martins et al., 2018)
DQ40A1	Superfície de equipamento de queijaria	(Ferreira et al., 2017)
INSA2808	Amostra de fezes humanas	Proveniente da coleção do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

### 3.2 Reagentes

Para a realização deste trabalho laboratorial foram utilizados vários reagentes, que estão descritos na tabela 9.

Tabela 9. Reagentes utilizados no trabalho laboratorial

Reagente	Marca
Agar	HIMEDIA
Tryptic Soy Broth (TSB)	Merck KGaA
Blood Agar (BA)	Lab-Lemco
Sangue de cavalo desfibrinado	Oxoid
Solução de Ringer	Sigma-Aldrich
Lixívia comercial	Ultra Pro
Vinagre de vinho branco	Paladin
AMUKINA	Angelini

### 3.3 Equipamentos

Também, para a elaboração de todos os procedimentos laboratoriais foi necessário recorrer a alguns equipamentos, que estão descritos na tabela 10.

Tabela 10. Equipamentos utilizados no trabalho laboratorial

Equipamento	Marca
Autoclave	Uniclave 88
Mini- centrífuga	Hettich Mikro 200 R V1.08
Câmara de segurança biológica	Bio air-Aura 2000
Banho hidrostático	Nahita Digital Water Bath 601/12
Contador de colónias	P-Selecta Digital S
Medidor de pH	Thermo Scientific Orion Star A211 pH Meter
Espectrofotómetro	Pharmacia Biotech-Ultrospec 3000
Estufa (30 °C)	Binder
Balança analítica	Sartorius CP 225 D
Balança de precisão	KERN PLJ 510-3M
Stomacher	Biomaster-Lab system

### 3.4 Armazenamento e preparação das estirpes

Em relação, ao armazenamento das estirpes utilizadas neste trabalho laboratorial, estas foram mantidas em tubos criogénicos a uma temperatura de -80 °C em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) com 20% (v/v) de glicerol (crioprotetor). Para cultura das estirpes estas foram inoculadas em placas com meio *Blood Agar* suplementado com 5% (v/v) de sangue de cavalo

desfibrinado (*Blood Agar* - BA) e incubadas a 30 °C em aerobiose por 24 horas. Antes da realização de qualquer tipo de ensaio as estirpes de *A. butzleri* foram subcultivadas em meio *Tryptic Soy Agar* (TSA), a 30°C durante 24 horas, para garantir o crescimento e pureza das estirpes.

### **3.5 Preparação da suspensão celular a usar nos ensaios de sobrevivência de *Arcobacter butzleri* a condições de stress**

Após subcultura em TSA, preparou-se uma suspensão celular em *Tryptic soy broth* (TSB) que foi usada para iniciar uma pré-cultura em meio líquido. Assim, foram inoculados 20 mL de meio TSB, num erlenmeyer de 100 mL, a uma densidade ótica a 620 nm ( $OD_{620nm}$ ) de aproximadamente 0,05, e incubados a 30 °C durante aproximadamente 16-17 h. Após este período, fez-se uma diluição de 1:20 da pré-cultura, pipetando-se 1 mL para um novo erlenmeyer contendo 20 mL de TSB e voltou-se a incubar durante 24 horas a 30 °C. Quando perpez as 24 horas leu-se a densidade ótica da cultura para se avaliar se não há contaminações e também para se realizar os diferentes ensaios que foram feitos neste trabalho (Campos et al., 2019). De seguida, uma quantidade definida de inóculo foi a centrifugar durante 5 minutos a 13400 rpm. Ao fim da centrifugação descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o depósito celular em solução de Ringer. Com o intuito de iniciar todos os ensaios com  $10^6$  UFC/mL, estabeleceu-se inicialmente uma relação entre a densidade ótica a 620 nm e as UFC/mL para cada uma das estirpes para as condições do estudo.

### **3.6 Avaliação da sobrevivência de *Arcobacter butzleri* quando sujeito a condições de stress, na ausência de matrizes alimentares**

De forma, a avaliar a sobrevivência de *A. butzleri* na ausência de matrizes alimentares quando sujeito a condições de stress, utilizou-se o protocolo descrito por Campos et al. 2019, com algumas modificações.

Assim, inicialmente preparou-se o inóculo como descrito no ponto 3.5, e foram testadas três condições de stress: térmico (55 °C), ácido (presença de vinagre a 15 % (v/v)) e químico (presença de AMUKINA a 2% (v/v)), como recomendado pelo fabricante.

Como controlo para estes ensaios prepararam-se dois tubos de ensaio (duplicados) com 4,95 mL de água destilada esterilizada e 50 µL de inóculo os quais foram colocados à temperatura ambiente, e amostras foram recolhidas aos 0 minutos, 30 segundos, 1 minuto, 3 minutos, 5 minutos e 15 minutos de incubação. O inóculo aplicado aos tubos foi ajustado para obter uma concentração celular inicial cerca de 10<sup>6</sup> UFC/mL nos tubos.

Para avaliar o efeito da temperatura, dois tubos com 4,95 mL de água destilada esterilizada previamente incubados a 55 °C foram inoculados com 50 µL de suspensão bacteriana, e incubados a uma temperatura de 55 °C durante 0 minutos, 30 segundos, 1 minuto, 3 minutos, 5 minutos e 15 minutos (Campos et al., 2019). Ao fim do tempo referido, procedeu-se a diluições sucessivas decimais em microplacas de 96 poços em solução de Ringer. Para se proceder à enumeração utilizou-se o método de gotas (10 µL para a placa de TSA em triplicado) ou de espalhamento (100 µL em placa de TSA) conforme adequado. Após aplicação em placa de TSA, incubou-se a 30 °C por 48 horas e procedeu-se à enumeração das colónias.

Para avaliar a sobrevivência de *A. butzleri* quando exposto a stress ácido, neste caso o vinagre, prepararam-se dois tubos de ensaio com 4,2 mL de água destilada esterilizada, 750 µL de vinagre e 50 µL de inóculo. Após adição do inóculo, os tubos foram incubados a temperatura ambiente e uma amostra recolhida aos 0, 0,5, 1, 3 e 5 minutos. A contagem das células cultiváveis foi realizada como descrito para o ensaio da temperatura.

Por último, para avaliar a sobrevivência de *A. butzleri* quando exposto à AMUKINA realizou-se um ensaio, onde se usou dois tubos de ensaio com 4,85 mL de água destilada esterilizada, 100 µL de AMUKINA e 50 µL de inóculo. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente e amostras recolhidas aos tempos de 0, 0,5, 1, 3 e 5 minutos, e as contagens de UFC/mL realizadas como descrito anteriormente.

Todos os ensaios foram realizados pelo menos duas vezes em dias independentes.

### **3.7 Avaliação da sobrevivência de *Arcobacter butzleri* em matrizes alimentares, quando sujeito a condições de stress**

De forma, a avaliar a sobrevivência de *A. butzleri* em matrizes alimentares, quando sujeito a condições de stress, utilizaram-se duas matrizes alimentares, uma matriz alimentar escolhida foi o peito de frango, porque *A. butzleri* é vastamente encontrado em carne de frango, e a outra matriz alimentar utilizada foi a alface “iceberg”, pois esta é um vegetal e este é tradicionalmente desinfetado para consumo usando vinagre ou AMUKINA. Assim as condições anteriores foram testadas utilizando matrizes alimentares de forma a perceber se o comportamento que foi obtido anteriormente na ausência de matrizes alimentares se

manteria na presença de matrizes alimentares. Para estes ensaios, utilizaram-se cinco das estirpes de *A. butzleri* usadas no ensaio anterior, as A6-1, AB28/11, CR21-1, INSA2808 e DQ40A1. Estas estirpes foram selecionadas com o intuito de se estudar estirpes de diferentes proveniências e assim usaram-se estirpes isoladas de água, de frango, vegetais, humanos e ambiente fabril de uma queijaria, respetivamente. A estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 foi selecionada, pois possui o cluster da urease, o qual lhe pode conferir maior resistência ao pH na eliminação de *A. butzleri*, por isso poderia ser interessante verificar a sua sobrevivência neste tipo de ensaios.

### **3.7.1 Avaliação do efeito de stress térmico em *Arcobacter butzleri* na presença de peito de frango**

Inicialmente, a carne de frango foi congelada para diminuir a carga microbiana. De seguida, o peito de frango foi cortado em pedaços com dimensões de cerca de 3×3 cm, os quais foram mergulhados em água a ferver durante 40 segundos. De seguida, os pedaços de frango foram colocados em placas de *Petri* na câmara de segurança biológica para secarem durante 15 minutos (Mild et al., 2011).

O inóculo teve de ter uma preparação prévia, como está descrito no ponto 3.5. De seguida, uma quantidade definida de inóculo foi a centrifugar durante 5 minutos a 13400 rpm. Ao fim da centrifugação descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o depósito celular em 900 µL de solução de Ringer.

Três gramas de carne de frango foram depois cortadas em pequenos pedaços para os sacos de *stomacher*. Para cada estirpe foram preparados os sacos, correspondendo a cada tempo de incubação (0, 5, 15, 30 minutos), e outro saco para a carne sem inóculo, para avaliação da esterilidade do produto. À carne de frango nos sacos de *stomacher* adicionou-se 200 µL de inóculo, originando uma concentração celular final de cerca de  $5 \times 10^6$  UFC/g de carne de frango. De seguida, os sacos foram ao *stomacher* durante 4 minutos na velocidade alta, para homogeneizar o inóculo com o alimento. Ao fim de todos os sacos estarem homogeneizados, aos sacos correspondentes aos 0 minutos adicionou-se 27 mL de solução de Ringer e levou-se ao *stomacher* durante 2 minutos à velocidade normal. Os sacos dos 5, 15, 30 minutos incubaram-se a 55 °C, ao fim do tempo colocaram-se num banho de água e gelo para arrefecer e depois adicionou-se 27 mL de solução de Ringer. Ao fim de se adicionar a solução de Ringer os sacos foram novamente ao *stomacher* durante 2 minutos na velocidade normal (Juneja et al., 2003). De seguida, fizeram-se as diluições decimais sucessivas em solução de Ringer, e por último, procedeu-se à contagem das UFC/mL pelo método de gotas ou

espalhamento como mais adequado. Todo este procedimento foi feito em duplicado e em pelo menos dois dias independentes.

### **3.7.2 Avaliação do efeito de stress ácido e químico em *Arcobacter butzleri* na presença de alface *iceberg***

A alface *iceberg* foi inicialmente preparada sendo cortada em pedaços para facilitar a sua desinfecção. Considerando o processo de desinfecção da alface, inicialmente esta foi lavada em água corrente, de seguida, mergulhou-se numa solução de lixívia (20 mL de lixívia comercial e 80 mL de água destilada estéril) durante 5 minutos. Depois, lavou-se outra vez a alface com água destilada esterilizada para retirar os excessos de lixívia, e por último a alface foi sujeita a esterilização por ultravioleta durante 30 minutos de cada lado, usando a lâmpada UV da câmara de segurança biológica (Kim et al., 2009). Durante este período, preparou-se o inóculo como descrito no ponto 3.5. e 3.8.1.

Após desinfecção da alface, pesaram-se 3 gramas e colocaram-se nos sacos de *stomacher*. Para cada estirpe foram preparados os sacos correspondentes a cada tempo de incubação (0, 1, 3 e 5 minutos), e outro saco para a alface sem inóculo, para avaliação da esterilidade do produto. Ao fim de alface estar nos sacos, adicionaram-se 200 µL de inóculo a uma concentração celular final de  $5 \times 10^6$  UFC/g de alface e colocou-se a 4 °C durante 24 horas, para simular o comportamento desde a venda do produto até ao consumidor (Huang et al., 2019).

Após as 24 horas aplicou-se o stress químico. Assim, no saco correspondente aos 0 minutos colocou-se logo 27 mL de solução de Ringer, por outro lado, no saco de *stomacher* correspondente aos períodos de incubação de 1, 3 e 5 minutos colocou-se a solução de AMUKINA (600 µL de AMUKINA e 29,2 mL de água destilada esterilizada) ou a solução de Vinagre (4,5 mL de vinagre e 25,3 mL de água destilada esterilizada). Ao fim de se perfazer os tempos do ensaio removeu-se a alface e colocou-se num saco de *stomacher* com 27 mL de solução de Ringer. De seguida, a alface com a solução de Ringer foi a homogeneizar ao *stomacher* durante 2 minutos na velocidade normal. Após este passo realizaram-se as diluições decimais sucessivas em tubo e passou-se para a placa de TSA pelo método de gotas ou espalhamento consoante aplicável. Ao fim de 48 horas procedeu-se à enumeração das colónias. As UFC/mL foram também determinadas na solução de vinagre e de AMUKINA. Este procedimento também foi feito em duplicado e em pelo menos dois dias independentes (Campos et al., 2019).

## Capítulo 4: Resultados e Discussão

*A. butzleri* é uma espécie bacteriana que tem suscitado preocupação relativamente ao setor alimentar. A dispersão de *A. butzleri* em toda a cadeia alimentar aponta para um potencial perigo para a saúde pública, devido ao consumo de água e alimentos contaminados. Por outro lado, este pressuposto é fortalecido, pela capacidade desta bactéria sobreviver em alimentos e água e pela resistência ao stress criados durante armazenamento e processamento.

Considerando a falta de conhecimento em relação ao comportamento de *A. butzleri* quando sujeito às várias condições de stress a que pode ser exposto para reduzir ou eliminar a contaminação microbiana, neste trabalho foi considerado o efeito de diferentes tipos de tratamentos aos quais os alimentos são sujeitos para o controlo microbiano.

Inicialmente, as condições de stress foram escolhidas tendo em conta a origem dos isolados de *Arcobacter butzleri*, e a prevalência desta bactéria tanto em carne de frango como em vegetais. A temperatura é um dos fatores que afeta as reações celulares metabólicas e também é um fator crítico que determina a sobrevivência e o crescimento de patógenos em várias matrizes alimentares (Huang et al., 2019). Assim, considerando o stress térmico, a temperatura de 55 °C que foi escolhida pela existência de isolados de carne de frango e também para simular a utilização de uma temperatura inadequada de cozimento (Campos et al., 2019). Por outro lado, para induzir stress químico selecionou-se a AMUKINA devido à existência de isolados de vegetais, sendo que a AMUKINA é um produto utilizado para a desinfecção de frutas e vegetais e de acordo com o fabricante, esta é capaz de eliminar bactérias e germes (Campos et al., 2019) e tem um efeito letal ou inibitório em microrganismos (Ferreira, 2009). Por último, como stress ácido, mas também com vertente de stress químico, utilizou-se o vinagre, devido a este ser muitas vezes utilizado em molhos para saladas e também utilizado para a desinfecção de frutas e legumes (Campos et al., 2019), tendo um efeito antimicrobiano, sendo pouco tóxico e não provocando danos ambientais (Ferreira, 2009).

### 4.1 Sobrevivência de *Arcobacter butzleri* quando sujeito a diferentes condições de stress na ausência de matrizes alimentares

Para avaliar o efeito do stress térmico, ácido e químico na sobrevivência de estirpes de *A. butzleri* com diferentes proveniências, começou por se considerar a sua sobrevivência quando

sujeitas às diferentes condições de stress na ausência de matrizes alimentares. Para a análise da sobrevivência de *A. butzleri* na ausência de matrizes alimentares, teve inicialmente de ter em conta a sobrevivência de *A. butzleri* não sendo exposto a stresses, durante o período equivalente ao dos ensaios.

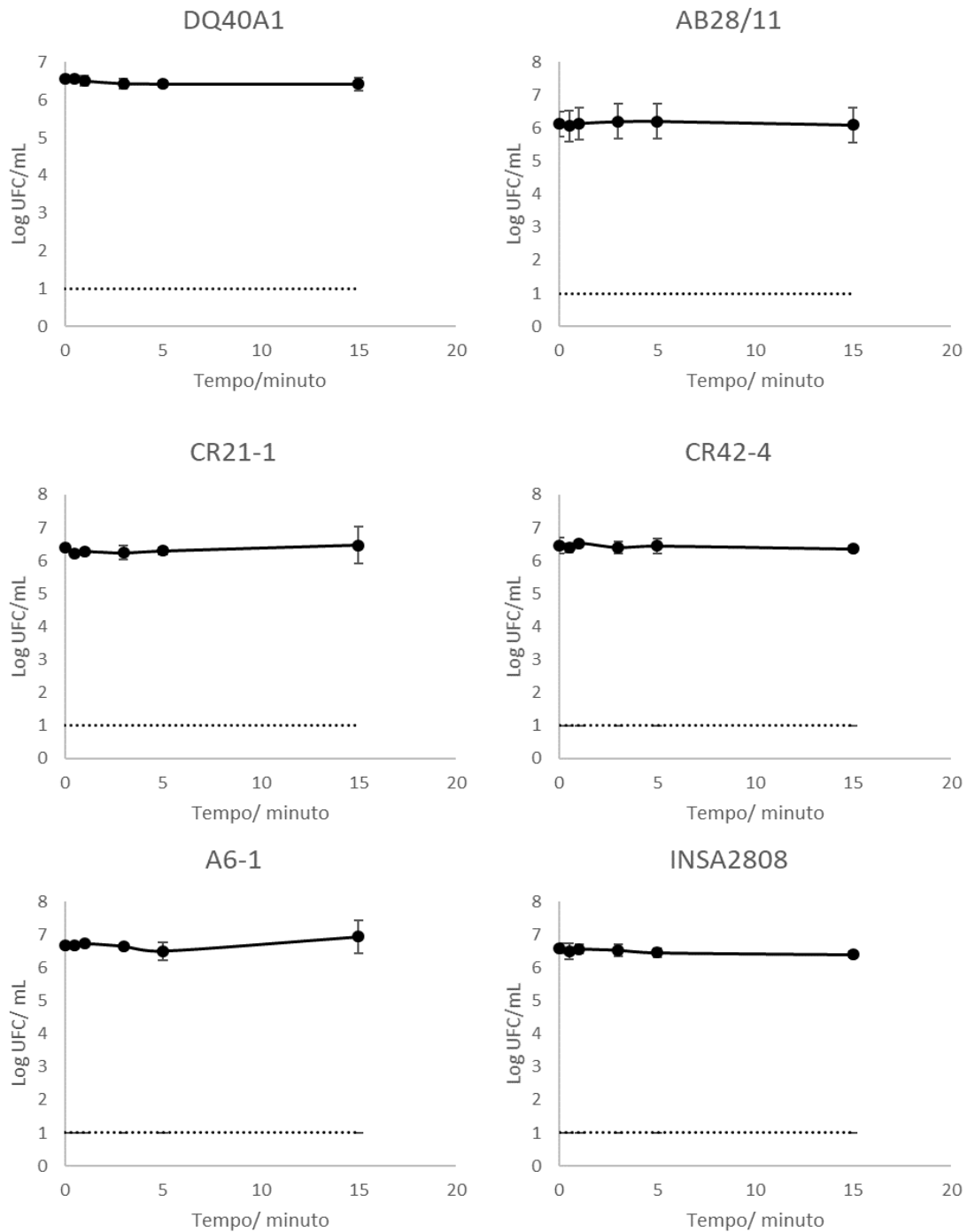


Figura 2. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* DQ40A1, AB28/11, CR21-1, CR42-4, A6-1, INSA2808 quando expostos à temperatura ambiente na ausência de matrizes alimentares. A linha a tracejado corresponde ao limite de deteção do método de enumeração.

Tendo em conta a observação destes gráficos da figura 2, relativos aos controlos realizados na ausência de matrizes alimentares e das condições de stress em estudo, pode-se constatar que o número células cultiváveis se mantém constante para todas as estirpes de *A. butzleri* no período de tempo estudado, desde os 0 minutos até ao período máximo de exposição de 15 minutos. Assim, o número de células ronda os 6 - 7 log UFC/mL ao longo do período de ensaio. Quando se observa o comportamento global das estirpes de *A. butzleri* verifica-se que não ocorrem diferenças no comportamento.

Assim, em forma de comparação, Driessche e Houf avaliaram a capacidade de sobrevivência de diferentes espécies de *Arcobacter* em água em diferentes condições de temperatura e observaram que a 20 °C (temperatura ambiente), os valores foram praticamente constantes na capacidade de sobrevivência de *A. butzleri* (Driessche & Houf, 2008). Contudo, estes autores constataram que a água e os produtos de origem alimentar possam ser as fontes mais óbvias de infeção, tendo em conta, que o objetivo deste trabalho era avaliar a capacidade de sobrevivência *in vitro* de *Arcobacter* em temperaturas que são aplicadas na indústria de alimentos (Driessche & Houf, 2008).

#### **4.1.1 Efeito do stress térmico na sobrevivência de *Arcobacter butzleri***

O efeito do stress térmico foi avaliado, porque a temperatura é um dos fatores fundamentais que afeta a sobrevivência e o crescimento de patógenos. Assim, o ensaio da temperatura na ausência de matrizes alimentares foi feito para todas as estirpes de *A. butzleri* utilizadas neste trabalho laboratorial. Neste ensaio, as estirpes foram sujeitas a uma temperatura de 55°C durante 15 minutos para tentar simular a temperatura subótima de confeção de alimentos.

Segundo o que foi observado pelos gráficos da figura 3, o stress térmico não foi eficaz na eliminação total de todos os isolados de *A. butzleri*, isto é, para as estirpes DQ40A1, AB28/11 e A6-1 (Figura 3), quando se verifica o tempo máximo deste ensaio, estas ainda apresentam células contáveis. Contudo, as estirpes *A. butzleri* DQ40A1, CR21-1 e A6-1 entre 1 minuto e os 15 minutos de exposição diminuíram 5 log UFC/mL. Para a estirpe *A. butzleri* AB28/11, inicialmente tinha um número de células de 6,5 log UFC/mL e diminuiu 1 log UFC/mL entre os 0 minutos e os 30 segundos, e até aos 15 minutos de exposição reduziu cerca de 4 log UFC/mL. Por outro lado, para as estirpes de *A. butzleri* CR42-4 e INSA2808 aos 15 minutos de exposição a 55 °C já não são detetáveis colónias de *A. butzleri*, ou seja, inicialmente o número de células era de 6,5 log UFC/mL e logo a partir dos 30 segundos de exposição houve uma redução no número de log UFC/mL. Contudo, aos 15 minutos de exposição a uma temperatura de 55 °C já não há sobrevivência de *A. butzleri*. Logo, tendo em conta este tratamento, as estirpes que apresentam uma maior sensibilidade térmica são a CR42-4 e a

INSA2808. Assim, tendo em conta que o inóculo inicial para todos os isolados de *A. butzleri* foi de cerca de 6 log UFC/mL, para as restantes estirpes de *A. butzleri* observou-se uma redução até 4 log UFC/mL com a temperatura de 55 °C.

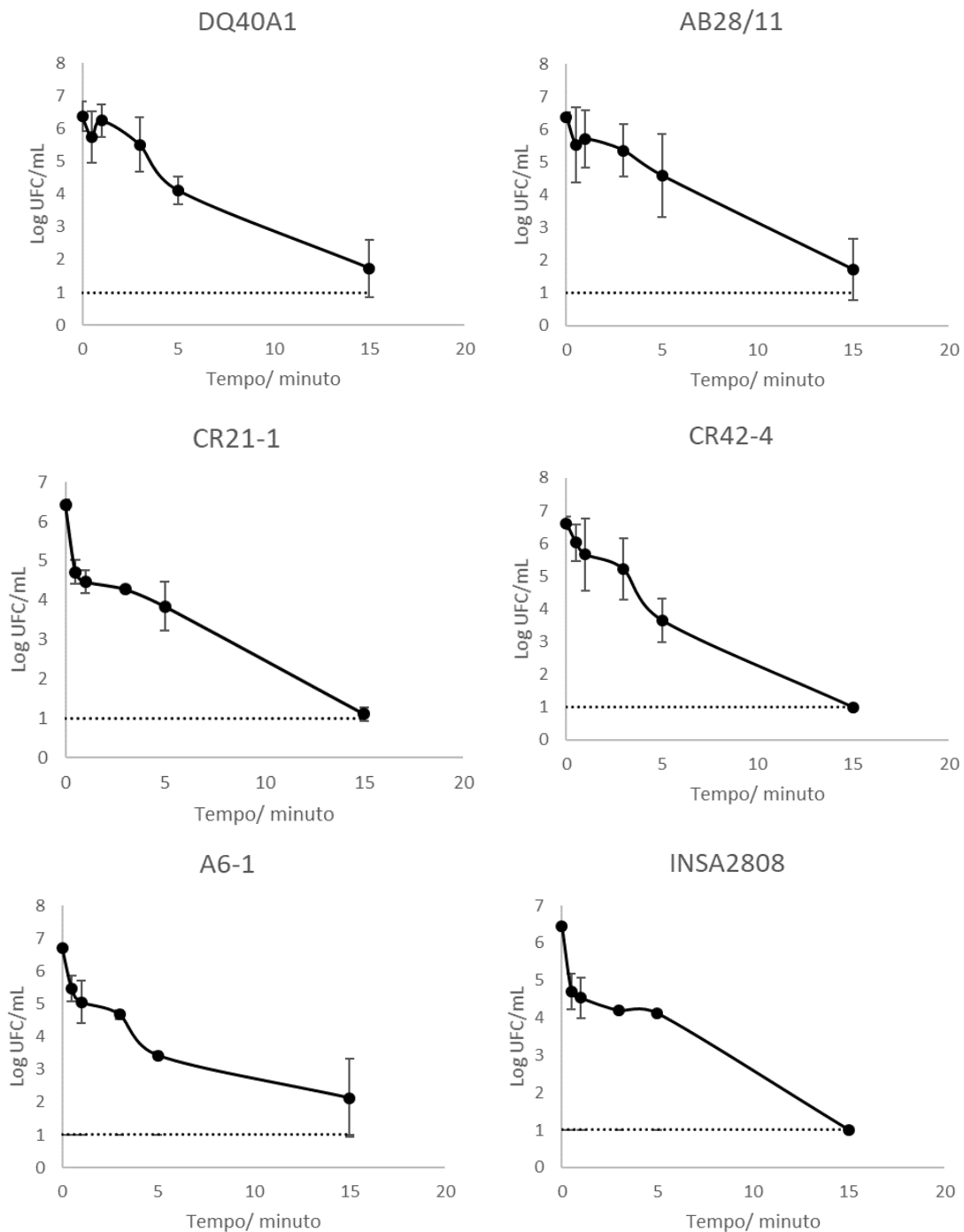


Figura 3. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* DQ40A1, AB28/11, CR21-1, CR42-2, A6-1, INSA2808 quando expostas ao tratamento térmico de 55 °C na ausência de matrizes alimentares. A linha a tracejado corresponde ao limite de deteção do método de enumeração.

Quando comparado este ensaio, a outros trabalhos que testaram também a capacidade de sobrevivência de vários microrganismos a altas temperaturas, constataram que à temperatura de 60 °C a eliminação de *Acinetobacter spp.* não foi efetivo para todos os isolados testados (Campos et al., 2019). No entanto, alguns isolados foram reduzidos a valores abaixo do limite de detecção da técnica de enumeração como também se constata com os resultados obtidos neste trabalho laboratorial. Num outro estudo onde testaram o efeito da temperatura na sobrevivência de *A. butzleri* em água, verificou-se que à temperatura de 55°C houve reduções decimais pouco significativas em algumas situações, sendo que esta temperatura foi suficiente para eliminar alguns dos isolados de *A. butzleri* testados, mas para outros isolados de *A. butzleri* não foi suficiente (D´Sa & Harrison, 2005). Assim, o mesmo aconteceu com o presente estudo em que a temperatura foi eficaz para algumas estirpes e para outras estirpes não foi eficaz como já foi referido anteriormente, demonstrando a variabilidade dos isolados desta bactéria.

Quando avaliado o efeito de temperaturas de escaldamento (52, 56, 60 °C), as espécies de *Arcobacter* testadas ainda sobreviveram durante vários minutos de incubação, isto é, para a temperatura de 52 °C *A. cryaerophilus* demorou 5 minutos a ser eliminado, *A. skirrowii* demorou 20 minutos a ser eliminado e em relação *A. butzleri* demorou 30 minutos a ser eliminado. Para a temperatura de 56 °C demoraram 18 minutos para *A. butzleri*, 6 minutos para *A. skirrowii* e 2 minutos para *A. cryaerophilus*. Por último e para a temperatura de 60 °C para *A. butzleri* demorou 4 minutos, para *A. cryaerophilus* demorou 30 segundos e para *A. skirrowii* demorou 1 minuto.

Assim, no estudo feito por Driessche e Houf (2008), estes autores constataram que para todas as espécies e para todas as temperaturas obtiveram-se reduções muito significativas, no entanto a tempos variáveis (Driessche & Houf, 2008). Enquanto que neste estudo feito por estes autores à temperatura de 56 °C, a eliminação de *A. butzleri* demorou 18 minutos, enquanto que à temperatura de 52 °C demorou 30 minutos (Driessche & Houf, 2008).

Assim sendo, as várias estirpes de *A. butzleri* têm características diferentes e isto pode ser um fator para que algumas estirpes sejam totalmente eliminadas com a ação da temperatura a 55 °C, isto é, as estirpes de *A. butzleri* podem ser mais resistentes à temperatura que outras.

#### **4.1.3 Efeito do stress ácido na sobrevivência de *Arcobacter butzleri***

O efeito do stress ácido na sobrevivência de *A. butzleri* foi realizado para se avaliar se o vinagre é um bom desinfetante de frutas e legumes. Assim, o ensaio com o vinagre, na ausência de matrizes alimentares foi feito para todas as estirpes de *A. butzleri* utilizadas neste trabalho laboratorial. Neste ensaio, as estirpes foram sujeitas a uma solução de vinagre

com uma concentração de 15% (v/v) que corresponde a uma concentração de ácido acético de 0,9% com um pH de 2,77, durante 5 minutos, para tentar analisar se o vinagre tem realmente um efeito antimicrobiano.

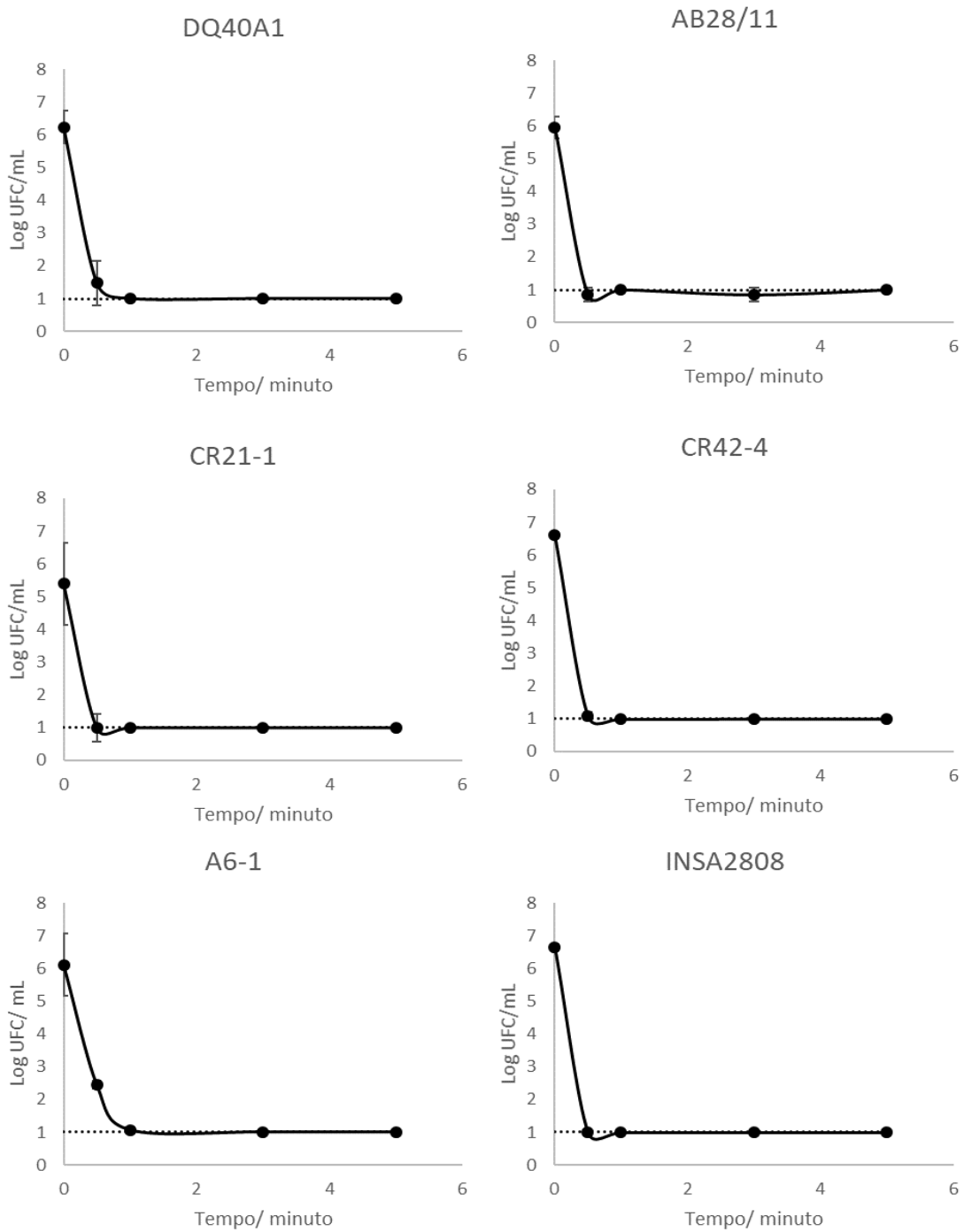


Figura 4. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* DQ40A1, AB28/11, CR21-1, CR42-2, A6-1, INSA2808 quando expostas ao tratamento com o vinagre na ausência de matrizes alimentares. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Com a observação dos gráficos da figura 4, relativos ao stress ácido pelo tratamento com vinagre na ausência de matrizes alimentares, visualizou-se que todos os isolados de *A. butzleri* foram sensíveis e houve reduções no número de log UFC/mL semelhantes em todas as estirpes. Assim, todos os isolados de *A. butzleri* apresentaram no início do ensaio um número de células cultiváveis de cerca de 6-7 log UFC/mL, sendo que estes foram reduzidos a valores indetetáveis pela técnica de enumeração após 30 segundos (*A. butzleri* INSA2808) ou 1 minuto (*A. butzleri* DQ40A1, AB28/11, CR21-1, CR42-4) de exposição com 15% (v/v) de vinagre. Logo, tendo em conta este tratamento, todas as estirpes de *A. butzleri* apresentam uma grande sensibilidade acídica, pois, já não apresentam colónias após 1 minuto de exposição com o vinagre.

Em relação à exposição ao vinagre, Campos e seus colaboradores fizeram um estudo semelhante, usando isolados de *Acinetobacter* e constataram que todos os isolados foram sensíveis, tendo sido observadas reduções semelhantes entre os isolados clínicos e alimentares. Sendo que, os isolados clínicos foram totalmente reduzidos a valores indetetáveis após 30 segundos a 10 minutos de exposição, enquanto que os isolados alimentares foram reduzidos após 5 a 10 minutos (Campos et al., 2019). Assim, em relação ao presente estudo existem muitas semelhanças, pois os isolados de *A. butzleri* foram reduzidos a valores indetetáveis logo após 30 segundos a 1 minuto.

Porém, ainda pouco se sabe sobre o efeito do vinagre nos microrganismos. Assim, Shin e seus colaboradores validaram tratamentos com ácido acético para inativar *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* e constataram que o ácido acético reduz o número de contaminação microbiana, o que mantém o controlo de patogéneos (Shin et al., 2006), isto também pode significar que a quantidade de ácido acético presente no vinagre pode ter uma grande influência na eliminação de *A. butzleri*, pois segundo os gráficos observados (Figura 4) ocorreu a eliminação de *A. butzleri* rápida e eficazmente.

Um parâmetro que tem de ser tido em conta neste ensaio com o vinagre é o pH, pois este pode ter influência sobre a sobrevivência de *A. butzleri*. O pH da solução do vinagre é de 2,77 que é um pH ácido, mas *Arcobacter butzleri* tem crescimento ótimo entre pH de 6,0 a 7,5, mas tendo em conta a observação dos gráficos da figura 4 e segundo estas condições *A. butzleri* conseguiu ainda sobreviver durante 30 segundos a 1 minuto de exposição. Esta situação nunca foi descrita, o pH mais baixo relatado anteriormente foi um pH de 5,0 especialmente em temperaturas não ideais (25 °C) até 2 dias (D'Sa & Harrison, 2005).

Tendo em conta a utilização do vinagre neste trabalho, tem de se perceber qual a influência da composição deste composto, isto é, a quantidade de ácido acético que este composto tem. A utilização de vinagre com o ácido acético vem já da antiguidade como formas de diminuição dos parasitas e também de algumas bactérias (Pinto, 2006). Segundo o que está descrito, a percentagem de acidez indicada na embalagem corresponde à percentagem de ácido acético

(Pinto, 2006). O vinagre para consumo tem de ter uma percentagem de 4 - 6 % de ácido acético, o que foi utilizado neste trabalho tem uma percentagem de 6 % como indicado na embalagem, levando a que o ensaio tenha sido realizado com uma percentagem de ácido acético de cerca de 0.9 %. Isto pode querer dizer que, o ácido acético possa ter um efeito na sobrevivência de *A. butzleri*, pois, o ácido acético é um acidulante muitas vezes usado na desinfecção (Pinto, 2006). Assim, uma forma de comparar o que foi dito anteriormente, Cervenka e os seus colaboradores estudaram o efeito dos ácidos orgânicos fracos, como é o ácido acético e constataram que estes são agentes conservantes sendo eficazes em baixas concentrações e podem reduzir o pH suficientemente para impedir o crescimento de microrganismos patogénicos. O estudo feito por Cervenka et al. (2004) mostrou que o ácido acético inibiu o crescimento de *A. butzleri*, embora a concentração usada nesse estudo fosse inferior (0,1; 0,2; 0,3%) àquela que foi utilizada no presente trabalho, isto demonstrou que o ácido acético foi o mais eficaz o que foi também associado ao baixo pH (4,3 a 5,9). Por outro lado, a maior atividade antimicrobiana do ácido acético pode ser explicada pela dissociação deste ácido (Cervenka et al., 2004). Contudo, é evidente, pelos autores que a influência do pH na sobrevivência das bactérias pode ser influenciada por fatores específicos dos alimentos e também pela composição nutritiva da cultura (Cervenka et al., 2004), mas que no presente trabalho não existiram.

#### **4.1.3 Efeito do stress químico na sobrevivência de *Arcobacter butzleri***

O efeito do stress químico foi avaliado para tentar perceber se a AMUKINA é um bom desinfetante para frutas e legumes. Assim, o ensaio com a AMUKINA, na ausência de matrizes alimentares foi feito para todas as estirpes de *A. butzleri* utilizadas neste trabalho laboratorial. Neste ensaio, as estirpes foram sujeitas a uma solução de AMUKINA com uma concentração de 2 % (v/v), o que corresponde a 0,02 % de hipoclorito de sódio, durante 5 minutos para tentar analisar se a AMUKINA tem realmente um efeito letal e inibitório de microrganismos.

Com a observação dos gráficos da figura 5 pode-se afirmar que o tratamento com a AMUKINA teve um comportamento semelhante ao tratamento com o vinagre, e conclui-se que foi eficaz para todas as estirpes de *A. butzleri*.

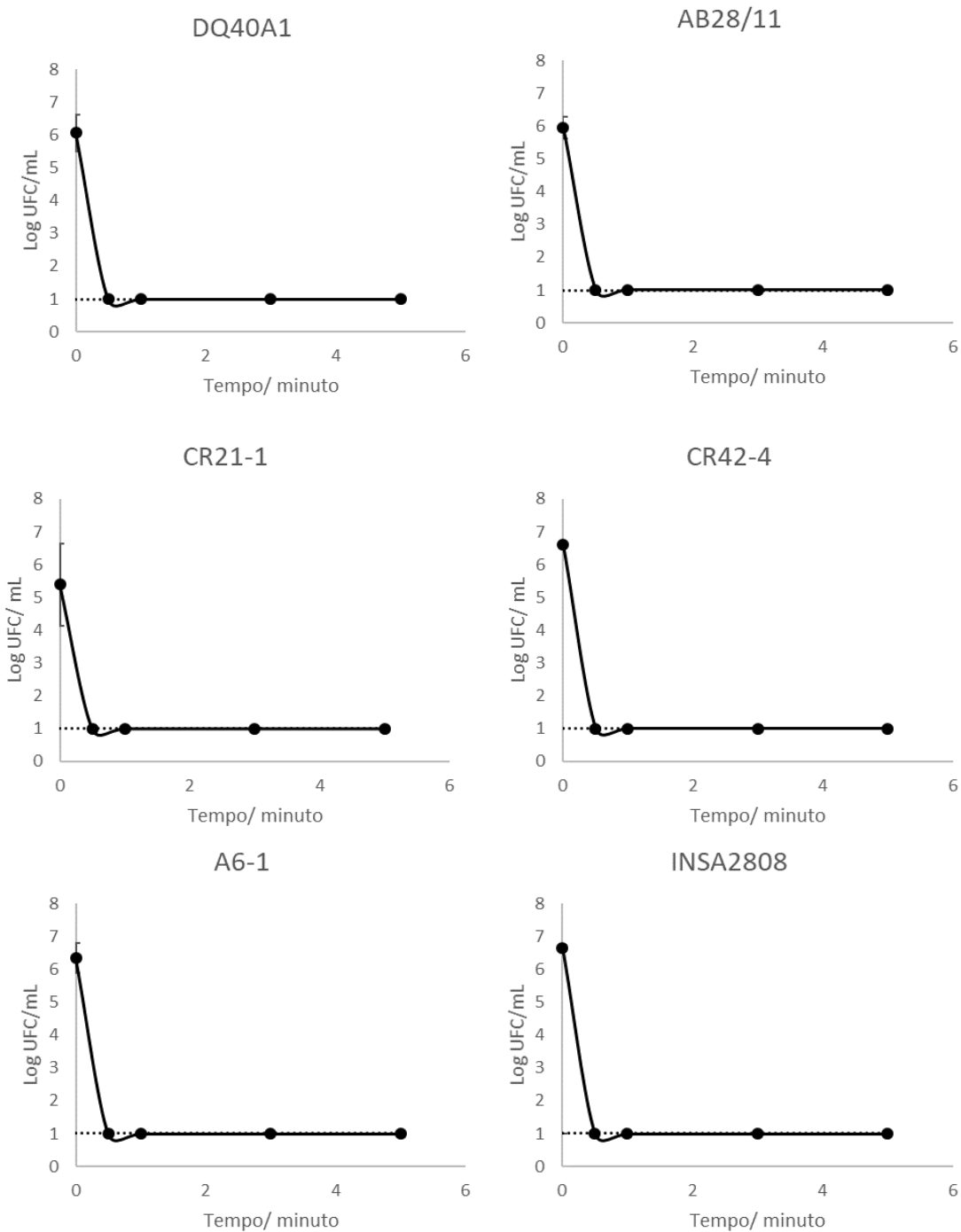


Figura 5. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* DQ40A1, AB28/11, CR21-1, CR42-4, A6-1, INSA2808 quando exposta ao tratamento com AMUKINA na ausência de matrizes alimentares. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Quando comparado, este ensaio com outros tratamentos com AMUKINA, outros autores estudaram a sobrevivência de isolados de *Acinetobacter* quando expostas a AMUKINA com uma concentração de 1% (v/v), e constataram que o tratamento com AMUKINA foi eficaz para todos os isolados clínicos e alimentares de *Acinetobacter*, permitindo assim reduções para

valores abaixo do limite da técnica de enumeração após 30 segundos para ambos os isolados clínicos e alimentares (Campos et al., 2019), o que também se observou neste presente estudo em que houve eliminação de *A. butzleri* logo a partir dos 30 segundos de exposição .

Num outro estudo foi testada a tolerância de *A. butzleri* ao hipoclorito de sódio. Assim, Rasmussen et al. (2013) utilizaram várias concentrações de hipoclorito de sódio, mostrando que uma concentração de hipoclorito de sódio de 0,2 % não teve efeito letal sobre *A. butzleri* mesmo após 20 horas de exposição. E que algumas das estirpes conseguiam sobreviver à concentração máxima recomendada para utilização no setor alimentar de 0,5 %. Os autores concluíram ainda que o tempo de contacto de desinfecção de 10 minutos utilizado normalmente no processo de higienização, pode não ser suficiente sendo que é provável que *A. butzleri* sobreviva a estes processos quando se usam concentrações de hipoclorito de sódio menores que 1% (Rasmussen et al., 2013). Assim sendo, comparando este estudo com o presente trabalho podemos constatar que concentrações de hipoclorito de sódio de cerca de 0,02 % foram eficazes em *Arcobacter* logo ao fim de 30 segundos de desinfecção.

## **4.2 Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* às diferentes condições de stress na presença de matrizes alimentares**

De seguida, para avaliar o efeito do stress térmico, ácido e químico na sobrevivência de estirpes de *A. butzleri* com diferentes proveniências, considerou-se a sua sobrevivência quando sujeitas às diferentes condições de stress na presença de matrizes alimentares, o peito de frango e a alface.

Tendo em conta a observação destes gráficos (Figura 6) relativos aos controlos realizados na presença de carne de frango, pode-se constatar que o número células cultiváveis se mantém constante para todas as estirpes de *A. butzleri* no período de tempo estudado, desde os 0 minutos até ao período máximo de exposição de 30 minutos. Assim, o número de células ronda os 6 - 7 log UFC/mL ao longo do período de ensaio. Quando se observa o comportamento global das estirpes de *A. butzleri* verifica-se que não ocorrem grandes diferenças no comportamento, mantendo assim um comportamento constante.

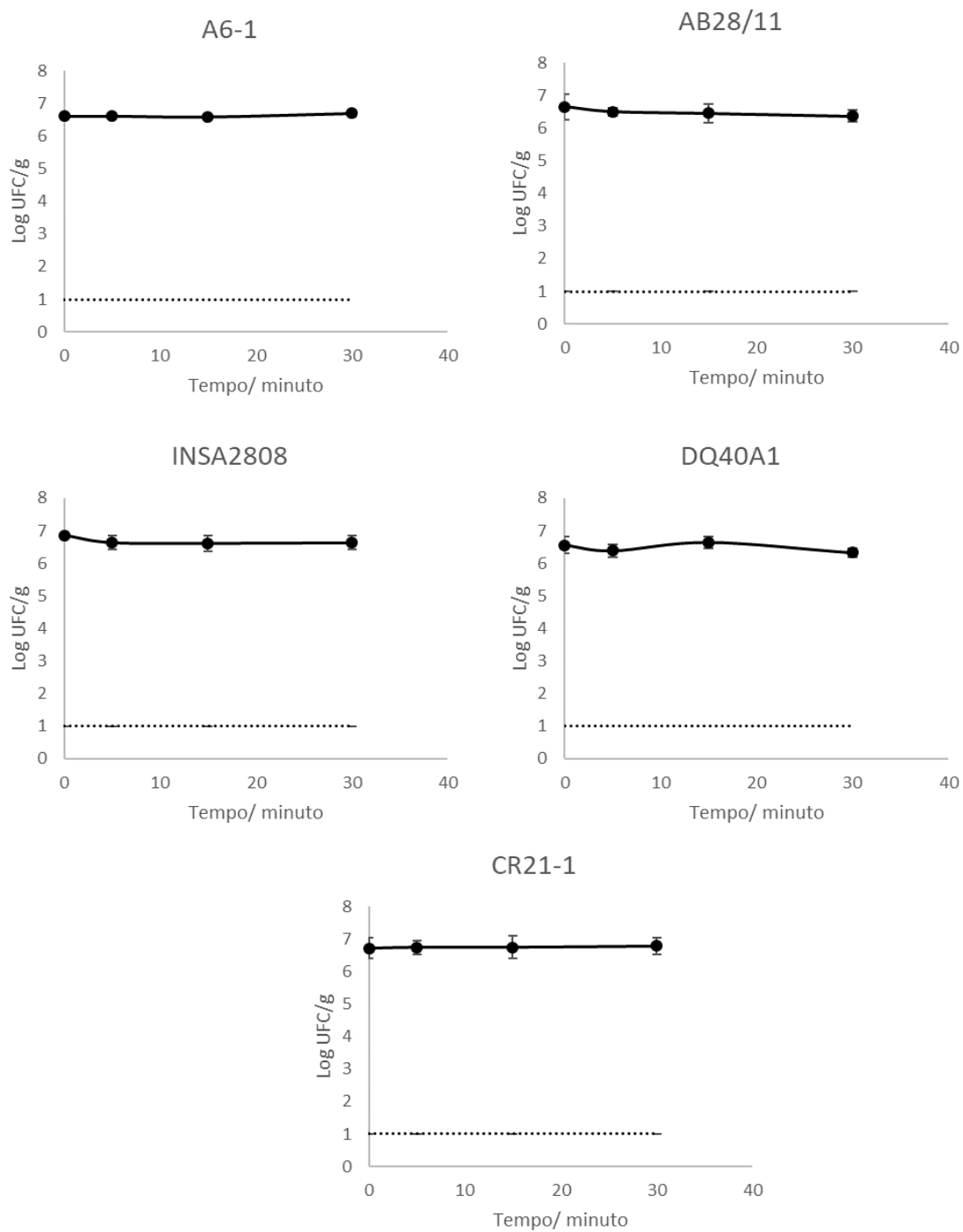


Figura 6. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* A6-1, AB28/11, CR21-1, DQ40A1, INSA2808 quando expostos à temperatura ambiente na presença da matriz alimentar, carne de frango. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

#### 4.2.1 Efeito do stress térmico na sobrevivência de *Arcobacter butzleri* na presença de peito de frango

Este ensaio foi realizado, para se avaliar se o efeito do stress térmico na sobrevivência de *A. butzleri* era igual na presença de matrizes alimentares neste caso, a carne de frango. Assim, o ensaio da temperatura na presença de matrizes alimentares foi feito para cinco das estirpes de *A. butzleri* utilizadas neste trabalho laboratorial. Neste ensaio, as estirpes foram sujeitas a uma temperatura de 55°C durante um período até 30 minutos para tentar simular a temperatura subótima de confeção da carne de frango.

Tendo em conta a observação dos gráficos da Figura 7, na presença de matriz alimentar (peito frango), considerando o tratamento térmico verificou-se uma redução na eficácia deste na presença de matriz alimentar quando comparado com os resultados obtidos na ausência de matriz alimentar (Figura 3). Tendo-se observado que para quase todas as estirpes de *A. butzleri* ainda existe um grande número de células contáveis, ou seja, ao fim de 30 minutos de exposição da matriz a uma temperatura de 55 °C, o logaritmo das unidades formadoras de colónias por grama de produto é de aproximadamente 5 (*A. butzleri* A6-1 e AB28/11), cerca de 4-2 (*A. butzleri* DQ40A1 e CR21-1) e de aproximadamente 1 (*A. butzleri* INSA 2808).

Por exemplo, as estirpes de *A. butzleri* A6-1, AB28/11 e CR21-1 tiveram um comportamento muito semelhante, isto é, inicialmente, o número de células foi de cerca de 6-7 log UFC/mL e ao fim de 30 minutos de exposição, o número de células foi de 4-5 log UFC/mL, isto quer dizer que não houve uma redução acentuada no número de células, ou seja, a redução foi de 1-2 log UFC/mL. Para a estirpe *A. butzleri* INSA 2808, o comportamento foi diferente em relação às estirpes anteriores, dado que ocorreu uma redução cerca de 5 log UFC/mL entre os 0 minutos e os 30 minutos. Para a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 ocorreu uma redução de 4,0 log UFC/mL entre os 0 minutos e os 30 minutos de exposição a 55 °C, quando em contacto com peito de frango. Assim, tendo em conta a exposição de *A. butzleri* à temperatura de 55 °C na presença de peito de frango, a estirpe que apresentou uma maior sensibilidade térmica, foi *A. butzleri* INSA 2808, embora o tratamento não tenha levado a uma eliminação a níveis indetetáveis.

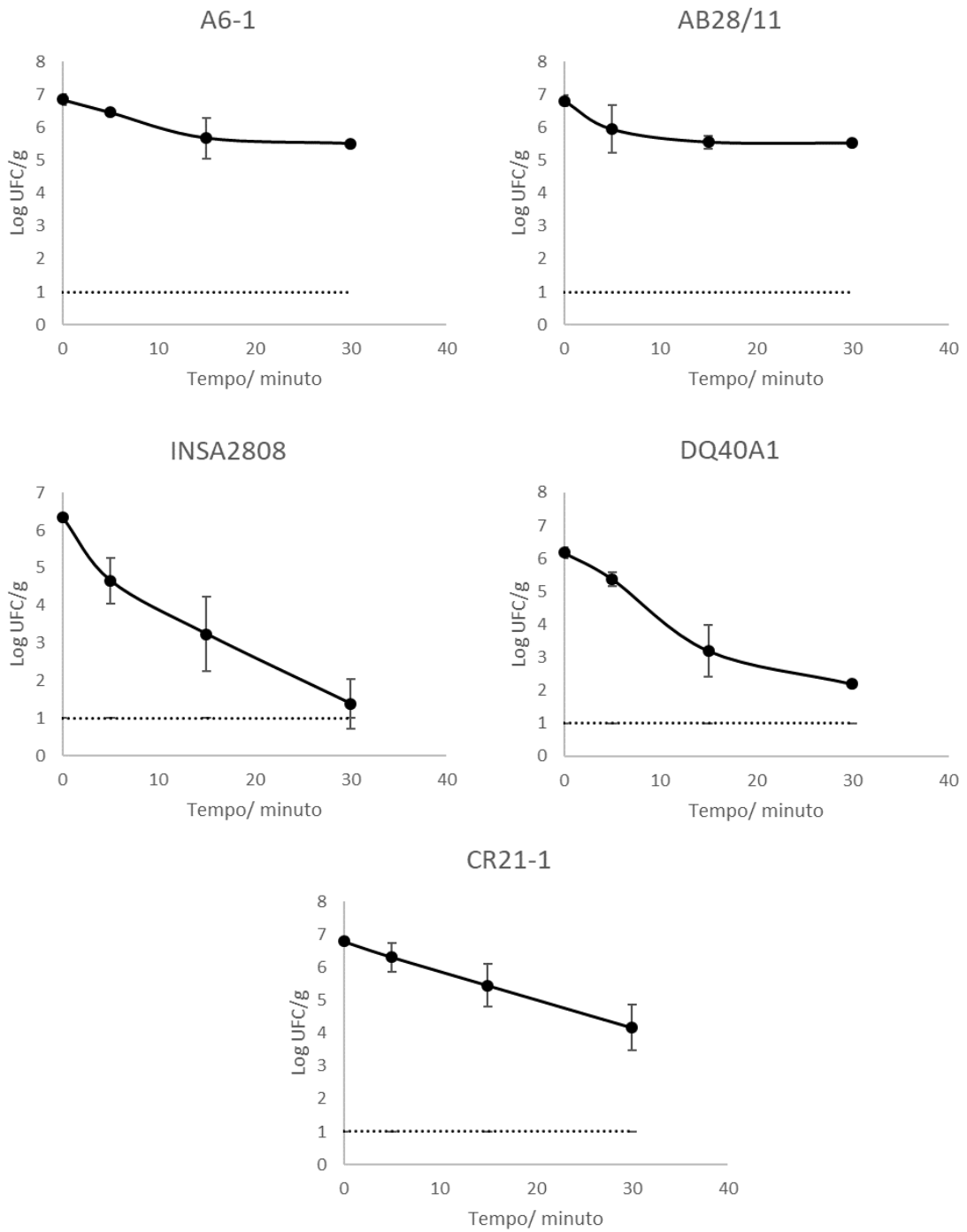


Figura 7. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* A6-1, AB28/11, INSA2808, DQ40A1, CR21-1 quando exposta ao tratamento térmico na presença da matriz alimentar, carne de frango. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Assim tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, em relação à sobrevivência dos isolados de *A. butzleri* em matrizes alimentares, que neste caso é a carne de frango,

constatou-se que a carne de frango conferiu proteção na sobrevivência das estirpes de *A. butzleri* ao stress térmico, pois globalmente as reduções não foram notórias e ao fim de 30 minutos de exposição a 55 °C ainda havia muitas colónias contáveis, cerca de 2-4 log UFC/mL. Enquanto que no caso dos ensaios realizados na ausência de matriz alimentar, de forma global, se verificou uma grande diferença no comportamento, ou seja, com a observação dos gráficos da figura 3 houve uma grande redução no número de UFC/mL em cerca de 4 log UFC/mL, enquanto que na presença de matrizes alimentares a redução no número de células foi inferior.

Comparando este ensaio com a matriz alimentar e o ensaio que foi feito anteriormente na ausência de matriz, existem muitas diferenças, pois, na ausência de matrizes alimentares houve grandes reduções nas UFC, ocorrendo mesmo eliminação de *A. butzleri*, enquanto que na presença de matrizes alimentares houve baixa redução não havendo eliminação de células contáveis desta bactéria. Esta situação pode resultar do facto de a carne de frango poder funcionar como proteção para os isolados de *A. butzleri*, pois, a carne com é o exemplo da carne de frango é uma matriz composta por muita gordura, por minerais, vitaminas, lípidos e proteínas (Degeer et al., 2016) e estes compostos de alguma maneira conferem proteção na eliminação de *A. butzleri*.

Há outros autores mencionaram que certas bactérias (*Salmonella* spp.) inoculadas em diferentes tipos de carnes, como por exemplo, hambúrgueres de porco (Gurman et al., 2016), carne de porco, peru e frango e caldo de galinha (Juneja et al., 2001) não sobreviveram a altas temperaturas. Por outro lado, Juneja e os seus colaboradores (2001) descobriram que diferentes espécies de *Salmonella* em caldo de galinha rapidamente exibiram reduções logarítmicas a 60 °C, com valores de D de 4,86 minutos a 0,41 minutos (Juneja et al., 2001). Assim, uma possível explicação para as diferenças nos valores de D entre as diferentes espécies de carne (porco, peru e frango), pode ser o efeito das diferentes espécies de carne e as diferenças no conteúdo de gordura entre os substratos. Em geral, sabe-se que a resistência ao calor de qualquer microrganismo é afetada não apenas por fatores genéticos inerentes, mas também por muitos fatores ambientais durante o aquecimento, como a sua composição e o pH (Juneja et al., 2001).

#### **4.2.3 Efeito do stress ácido na sobrevivência de *Arcobacter butzleri* na presença de alface iceberg**

Este ensaio foi executado, para se estimar se o efeito do stress ácido na sobrevivência de *A. butzleri* na presença de matrizes alimentares neste caso, a alface *iceberg*, seria semelhante ao verificado na sua ausência. Assim, o ensaio com o vinagre na presença de matrizes alimentares foi feito para cinco das estirpes de *A. butzleri* utilizadas neste trabalho

laboratorial. Neste ensaio, as estirpes foram sujeitas a uma solução de vinagre com uma concentração de 15% (v/v) correspondendo a 0,9% de ácido acético durante 5 minutos para tentar simular uma aplicação deste agente como antimicrobiano na desinfecção de saladas. Inicialmente para inferir acerca do efeito da conservação em refrigeração, procedeu-se a uma contagem de células cultiváveis antes e depois de incubação a matriz alimentar contaminada com *A. butzleri* a 4 °C durante 24 horas, isto para avaliar se as células de *A. butzleri* presentes na matriz perdem viabilidade celular.

Tabela 11. Número de UFC/g para as estirpes de *Arcobacter butzleri* antes e depois da incubação da alface a 4 °C durante 24 horas

Estirpe de <i>A. butzleri</i>	Log UFC/g de alface antes da incubação a 4 °C durante 24 horas	Log UFC/g de alface depois da incubação a 4 °C durante 24 horas
A6-1	7,09±0,08	5,92±0,46
AB28/11	7,02 ±0,02	6,10±0,41
CR21-1	6,95±0,13	6,16±0,06
DQ40A1	6,82 ±0,04	4,18±0,01
INSA2808	5,77±0,02	4,45±0,37

Nota: valor da média ± desvio padrão

Assim, o número de células antes da incubação a 4 °C durante 24 horas ronda os 6-7 log UFC/g de alface, enquanto que, o número de células depois da incubação a 4 °C durante 24 horas ronda os 4-6 log UFC/g de alface (Tabela 11), indicando uma diminuição do número de células cultiváveis por armazenamento em condições de refrigeração. Quando se observa o comportamento global das estirpes de *A. butzleri* verifica-se uma maior suscetibilidade à refrigeração por alguns isolados.

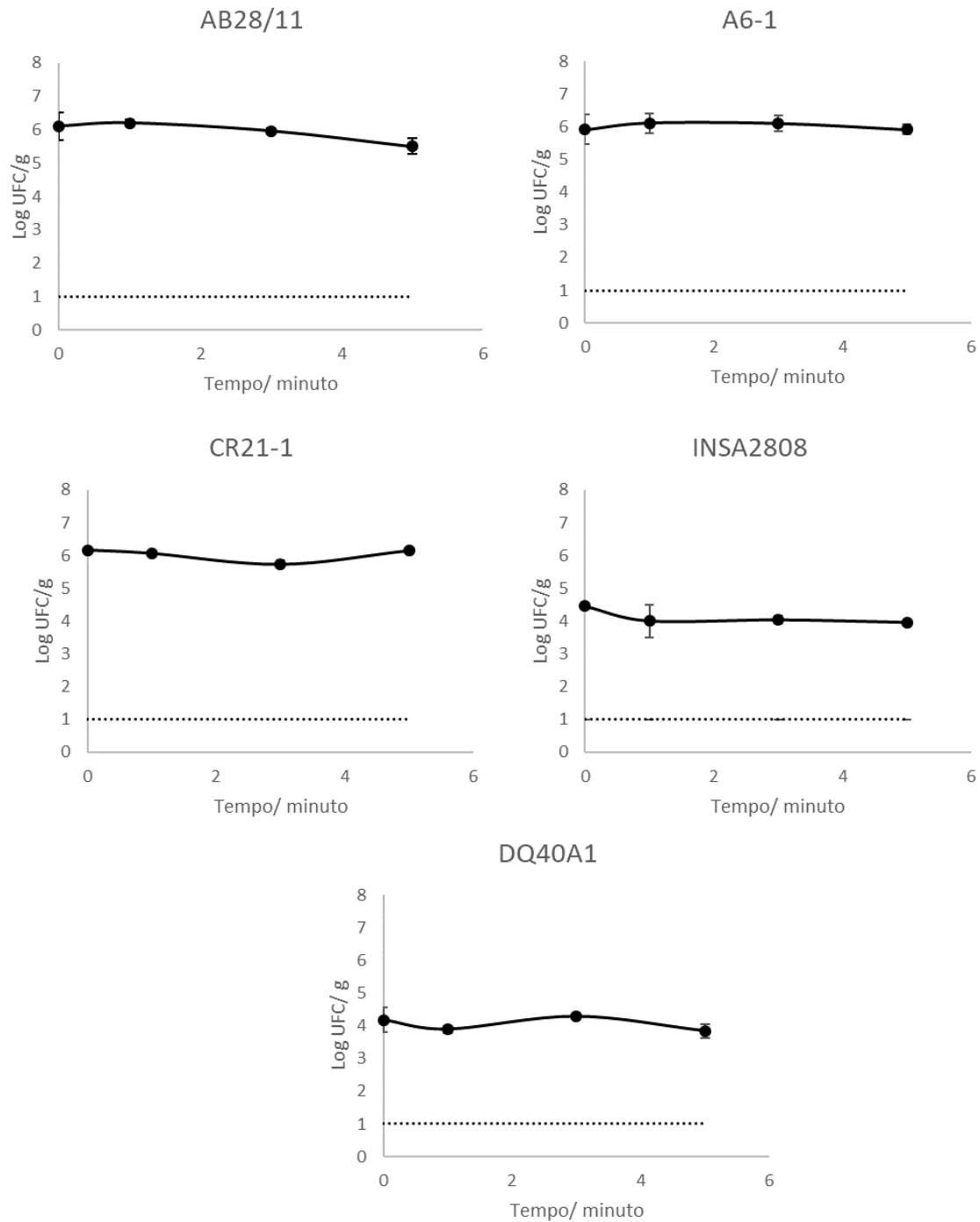


Figura 8. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* A6-1, AB28/11, CR21-1, INSA2808 e DQ40A1 quando expostas à temperatura ambiente na presença da matriz alimentar, alface *iceberg*, após incubação das estirpes com a alface durante 24 horas em refrigeração. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Tendo em conta a observação dos gráficos da figura 8, relativos aos controlos realizados na presença da matriz alimentar, alface *iceberg*, pode-se constatar que o número células

cultiváveis se mantêm constante para todas as estirpes de *A. butzleri* no período de tempo estudado, desde os 0 minutos até ao período máximo de exposição de 5 minutos.

Por último, pode-se concluir que após a incubação da alface com o inóculo a 4 °C durante 24 h, ocorreu uma redução no número de UFC/g de alface, isto pode-se dever às baixas temperaturas levarem à perda de viabilidade celular por parte das estirpes de *A. butzleri*. Em comparação com outro estudo feito por Lee e Choi (2013) que examinaram a sobrevivência de *A. butzleri* em purés de maçã e pera a 4 °C e constataram que à temperatura de 4°C também observaram uma redução de 7 log UFC/g após 24 - 48 horas de incubação (Lee & Choi, 2013).

Inicialmente, esta matriz alimentar foi incubada com o inóculo previamente a 4°C durante 24 horas, para simular o comportamento durante o armazenamento do mesmo no frigorífico. Ao fim dessas 24 horas, e ao fim de perfazer os vários tempos de incubação do ensaio, retirou-se a matriz alimentar e fizeram-se as contagens do número de células cultiváveis na solução com Vinagre proveniente da incubação com a alface e inóculo, constatando-se que não havia células cultiváveis de *A. butzleri* nesta solução. Sendo assim, as contagens foram feitas só na matriz alimentar, neste caso, a alface *iceberg*. Assim, após a incubação da alface e do inóculo a 4 °C durante 24 horas verificou-se uma redução das células contáveis, isto quer dizer que as células presentes na matriz alimentar possam ter perdido a viabilidade celular (Tabela 11).

Após a observação dos gráficos da figura 9 e apesar do número inicial de células, verificou-se que para uma das estirpes este ensaio com o vinagre não foi eficaz na eliminação desta bactéria, como é o caso da *A. butzleri* CR21-1, mas para as restantes estirpes este ensaio foi eficaz. Para a estirpe *A. butzleri* CR21-1, o número inicial de células foi de 6 log UFC/mL, sendo que ao fim dos 5 minutos de exposição o número de células baixou para 4 log UFC/mL, isto quer dizer, que entre os 0 minutos e os 5 minutos de exposição houve uma redução de 2 log UFC/mL. Para a estirpe *A. butzleri* A6-1, o número de células inicial foi de 6,5 log UFC/mL, ao fim de 5 minutos de exposição ao vinagre já não existem células de *A. butzleri*, ou seja, houve uma redução no número de células para níveis indetetáveis.

Na estirpe *A. butzleri* DQ40A1, o número inicial de células foi de 5,5 log UFC/mL. Ao fim de 1 minuto de exposição ao vinagre verificou-se uma redução do número de células cultiváveis apontando para uma eliminação de *A. butzleri* a níveis indetetáveis pelo método usado, logo este ensaio foi eficaz para esta estirpe na eliminação de *A. butzleri*. Para a estirpe *A. butzleri* INSA 2808, o número de células inicial foi de 5 log UFC/mL e ao fim dos 5 minutos de exposição já não existem células contáveis de *A. butzleri*. Por último, para a estirpe de *A. butzleri* AB28/11, o número inicial de células foi de 4,6 log UFC/mL. Após 1 minuto de exposição o número de células reduziu para 1 log UFC/mL. Entre o minuto 1 e os 3 minutos de exposição o número de células manteve-se constante e aos 5 minutos de exposição já não

existem células cultiváveis contáveis, ou seja, já não há sobrevivência de *A. butzleri* quer dizer que este ensaio foi eficaz para a AB28/11.

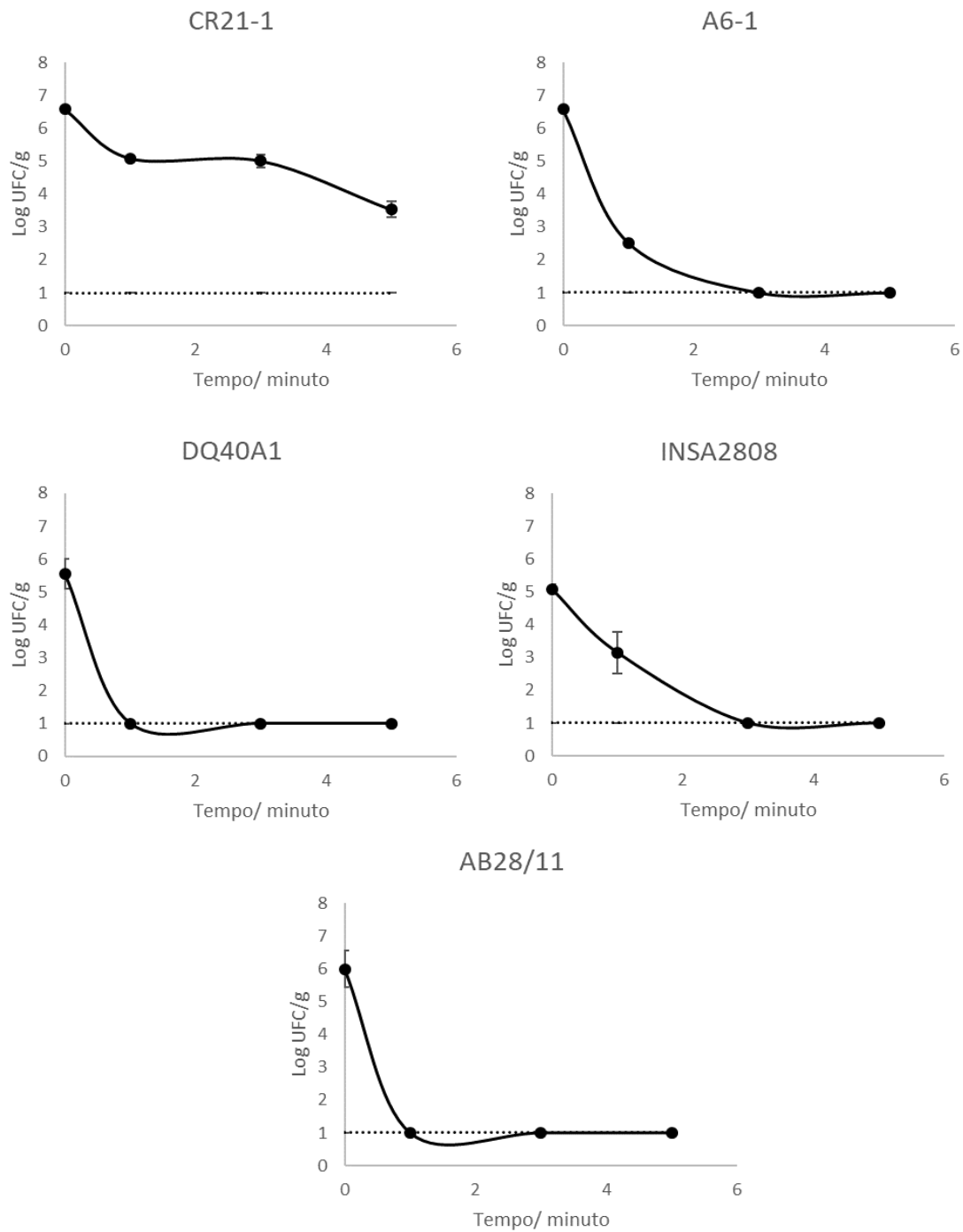


Figura 9. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* A6-1, CR21-1, DQ40A1, INSA2808 e AB28/11 quando expostas ao tratamento com o vinagre a 15 % (V/V) na presença da matriz alimentar, alface *iceberg*. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Este ensaio, no presente trabalho demonstrou-se ineficaz na desinfecção de alface contaminada com um dos isolados de *A. butzleri*, sendo que se verifica uma possível proteção pela matriz alimentar na eliminação dos isolados de *A. butzleri*. De facto, o comportamento na presença de matriz alimentar foi diferente em relação ao comportamento na ausência de matriz alimentar. Na ausência de matriz alimentar, o tratamento com o vinagre eliminou todos os isolados de *A. butzleri* após 30 segundos a 1 minuto de contato (Figura 4), enquanto que na presença de alface, quando eficaz, o tratamento com o vinagre levou mais tempo na eliminação dos isolados de *A. butzleri* a níveis indetetáveis, e no caso do isolado CR21-1 não permitiu a eliminação (Figura 9).

Em comparação com outros estudos, como por exemplo, Campos et al. (2019) estudou o efeito do tratamento com o vinagre na mesma concentração usada no presente estudo na eliminação de *Acinetobacter* spp. e constataram que todos os isolados de *Acinetobacter* foram reduzidos a valores indetetáveis e demonstraram que o vinagre demonstrou ser uma boa maneira de desinfetar frutas e vegetais contaminados (Campos et al., 2019).

Em comparação com outros estudos, como é o exemplo de Gutiérrez-Alcántara et al. (2015), onde estes autores utilizaram o ácido acético a 0,5% (v/v) para desinfetar dois tipos de tomates contaminados com *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Typhi num procedimento idêntico ao usado no presente trabalho, estes observaram uma redução logarítmica de 2 - 2,6 log na utilização de ácido acético na eliminação destes dois tipos de microrganismos (Gutiérrez-Alcántara et al., 2015). Contudo, o vinagre não é só composto por ácido acético, mas também por compostos fenólicos, açúcares, álcoois, compostos voláteis e aromáticos, vitaminas e sulfitos (Ferreira, 2009). Por isso não se pode concluir que só o ácido acético inibe o crescimento de bactérias, mas, também os outros compostos que estão presentes no vinagre podem inibir o crescimento das bactérias.

Ramos e seus colaboradores estudaram as propriedades de vários tipos de vinagre (vinagre balsâmico, solução de vinagre de vinho branco e ácido acético) na *Listeria monocytogenes* na presença de alface *iceberg*. E constataram que o método tradicional de desinfecção da alface (imersão da alface em água) não é eficaz na eliminação de *L. monocytogenes* na alface.

Quando se utiliza o vinagre balsâmico obtiveram-se reduções muito significativas no número de células, sendo que também quando se utilizou a solução de vinagre de vinho branco (15%(v/v)) se obtiveram grandes reduções na eliminação de *L. monocytogenes*. As soluções de ácido acético e vinagre de vinho branco mostraram uma eficiência semelhante na eliminação de *L. monocytogenes* (Ramos et al., 2014). Os autores concluíram que 15% (v/v) de vinagre de vinho branco (a mesma proporção usada neste estudo) teve um efeito bactericida contra *L. monocytogenes* isolado de alface (Ramos et al., 2014). Contudo, ainda pouco se sabe sobre o efeito do vinagre em *Arcobacter butzleri*, no entanto, podemos concluir com a observação

dos ensaios realizados, que a desinfecção com vinagre de vinho branco mostrou ser ineficaz na eliminação de alguns isolados de *A. butzleri*.

Como está descrito na literatura, o pH também influencia a eliminação de microrganismos em matrizes alimentares como é o exemplo da alface que foi a matriz utilizada neste trabalho laboratorial. Assim, neste ensaio foi medido o pH da solução de vinagre com a alface e este era de 2,81, ou seja, o pH observado é muito ácido em comparação ao pH ótimo de crescimento para *A. butzleri* (6,0 a 7,5). Pela análise dos resultados obtidos verifica-se que na presença da matriz ainda há sobrevivência de *A. butzleri* em pH ácidos ao fim de 5 minutos de exposição dos isolados ao vinagre. Skrivanová e seus colaboradores testaram o ácido acético e cítrico em concentrações acima de 0,2 %, onde estas inibiram o crescimento de *A. butzleri*, sem células viáveis detetadas após 4 a 5 horas de incubação. Oito ácidos com maior atividade antimicrobiana de entre os 17 testados foram posteriormente testados na eliminação *A. butzleri* em pele de frango para observar o seu potencial como conservantes de alimentos e também revelaram que a matriz alimentar estudada por estes autores influenciava e conferia proteção na eliminação de *A. butzleri*. Por outro lado, o tratamento com ácido ascórbico, benzoico, láctico málico e cítrico diminuiu significativamente os valores de pH imediatamente após o tratamento. Assim, os dados do pH indicam que a redução do crescimento bacteriano pode ser causada por um ambiente ácido. No entanto, em relação às contagens de *Arcobacter* quando sujeito a pH obtidos com diferentes ácidos orgânicos, os autores sugerem que a redução do pH provavelmente não foi o único fator que influenciou o crescimento bacteriano, dado que para o mesmo valor de pH o comportamento obtido é dependente do ácido usado. Assim, com este estudo conclui-se que o uso dos ácidos orgânicos é um método promissor nos processos de descontaminação dos alimentos, porque as práticas de processamento e higienização e os programas de HACCP na indústria são muitas vezes insuficientes para impedir a presença ou inibir o crescimento de patógenos (Skrivanová et al., 2011). Contudo, apesar de no estudo de Skrivanová et al. (2011) o uso de ácidos orgânicos nomeadamente ácido acético se ter demonstrado eficiente na eliminação de *A. butzleri* em pele de frango, no presente estudo o uso do vinagre que tem na sua composição ácido acético, não foi eficaz na eliminação de *A. butzleri* em alface iceberg, isto pode dizer que a composição do desinfetante e a composição das matrizes alimentares podem influenciar os processos de eliminação e desinfecção de *A. butzleri*.

#### **4.2.2 Efeito do stress químico na sobrevivência de *Arcobacter butzleri* na presença de alface iceberg**

Este ensaio foi realizado para avaliar o efeito do stress químico na sobrevivência de *A. butzleri*, se o efeito na ausência de matrizes alimentares era igual ao efeito na presença de

matrizes alimentares neste caso, a alface iceberg. Assim, o ensaio com a AMUKINA na presença de matrizes alimentares foi feito para todas as estirpes de *A. butzleri* utilizadas neste trabalho laboratorial. Neste ensaio, as estirpes foram sujeitas a uma solução de AMUKINA com uma concentração de 0,02 % (v/v) de hipoclorito de sódio durante 5 minutos para tentar analisar se a AMUKINA tem realmente um efeito de inibição ou eliminação de microrganismos.

Com o ensaio com a AMUKINA as estirpes *A. butzleri* DQ40A1 e INSA 2808 também perderam viabilidade celular. Assim, tendo em conta a observação dos gráficos da figura 10, na presença de matriz alimentar (alface), este tratamento com a AMUKINA não foi eficaz para algumas das estirpes de *A. butzleri*, sendo que ao fim de 5 minutos de exposição da matriz contaminada à AMUKINA ainda existe sobrevivência de *A. butzleri*.

O comportamento das estirpes de *A. butzleri* A6-1 e CR21-1 foi muito semelhante, onde inicialmente o número de células foi cerca de 6 log UFC/mL e após 5 minutos de exposição à AMUKINA o número de células foi cerca de 5 log UFC/mL, verificando-se uma redução cerca de 1 log UFC/mL. Assim com este ensaio demonstrou-se a ineficácia do processo na desinfecção de alface contaminada com *A. butzleri*, tal como a proteção que a matriz alimentar confere a *A. butzleri* no caso destas duas estirpes. Por comparação com os gráficos da figura 5 verifica-se que o perfil de sobrevivência é completamente diferente, ou seja, nos ensaios com matriz alimentar em alguns casos não há eliminação completa dos isolados de *A. butzleri*, enquanto, que nos ensaios sem matriz alimentar há eliminação de *A. butzleri* a níveis indetetáveis. Assim, para a estirpe *A. butzleri* DQ40A1, o número inicial de células foi de 5,0 log UFC/g, e após 1 minuto de exposição desta estirpe à AMUKINA o número de células chegou a níveis indetetáveis. Para a estirpe *A. butzleri* INSA 2808, o número de células inicial foi de 4,5 log UFC/g e ao fim de 5 minutos de exposição, o número de células foi cerca de 2 log UFC/g, logo, apesar de ocorrer uma redução muito acentuada, este ensaio para esta estirpe não foi eficaz. Por último, para a estirpe *A. butzleri* AB28/11, o número de células inicial foi de 6,5 log UFC/g. A partir do 1 minuto de exposição há uma ligeira redução no número de células, sendo que entre o 1 e os 3 minutos, o número de células manteve-se constante. Por último, entre os 3 minutos e os 5 minutos houve uma redução do log UFC/g chegando aos 5 minutos a níveis indetetáveis. Neste caso, o ensaio para esta estirpe foi eficaz, pois, aos 5 minutos não houve sobrevivência de *A. butzleri*.

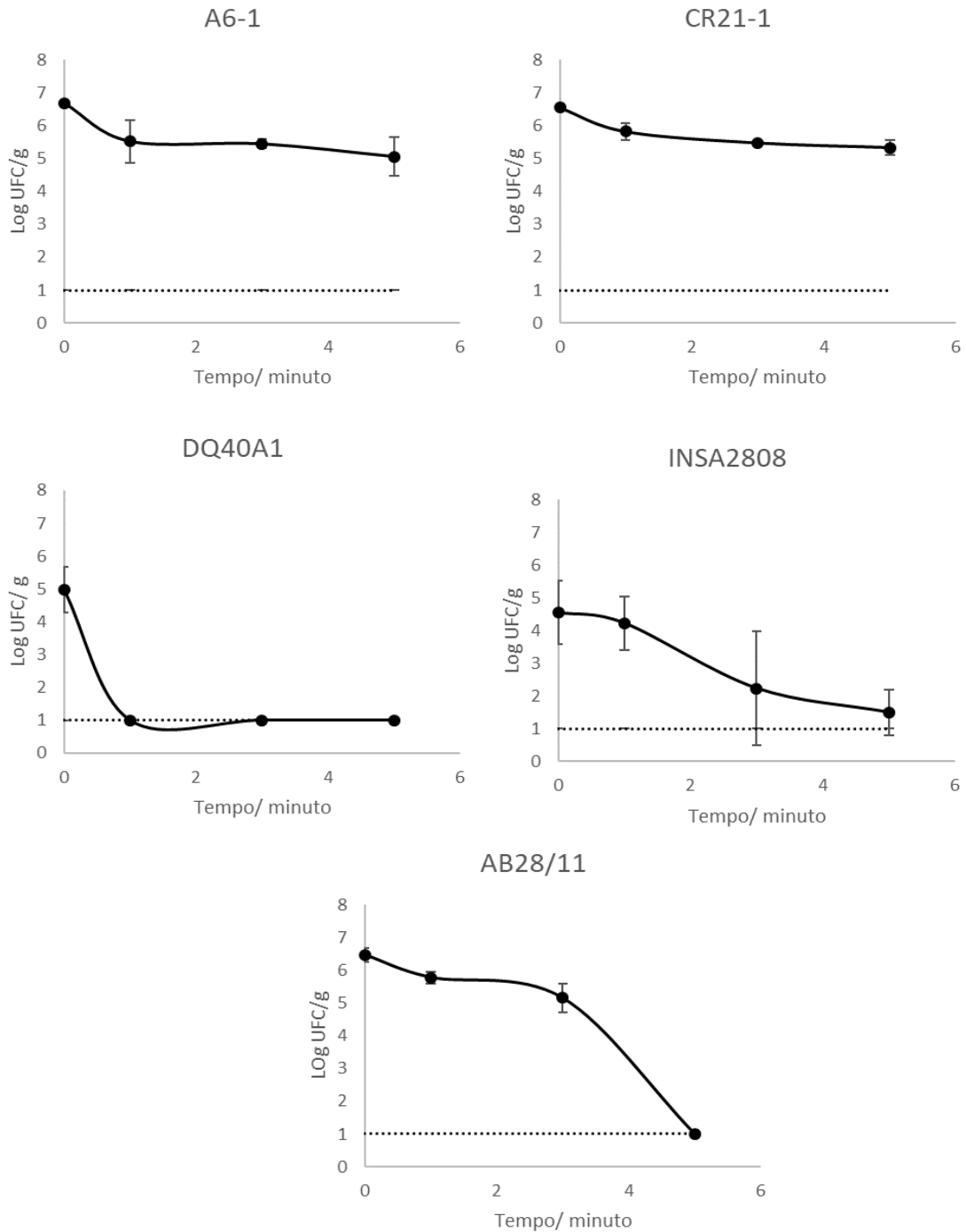


Figura 10. Sobrevivência das estirpes de *Arcobacter butzleri* A6-1, CR21-1, DQ40A1, INSA2808 e AB28/11 quando expostas ao tratamento com AMUKINA 2 % (V/V) na presença da matriz alimentar, alface *iceberg*. A linha a tracejado corresponde ao limite de detecção do método de enumeração.

Outros autores como é o exemplo do trabalho de Campos et al. (2019), na qual estes autores constataram que todos os isolados de *Acinetobacter* foram afetados pelo tratamento com AMUKINA e constataram que a matriz alimentar não conferiu proteção à sobrevivência dos

isolados de *Acinetobacter*. Onde segundo os autores deste estudo, a utilização da AMUKINA a 1 % (v/v) de hipoclorito de sódio foi eficaz na eliminação de *Acinetobacter spp.* (Campos et al., 2019).

Gutiérrez- Alcántara et al. (2015) também utilizaram o hipoclorito de sódio a 10 % (v/v) para estudarem a sobrevivência de *Salmonella* em tomates quando sujeitos a este tratamento e obtiveram reduções muito significativas, isto é, a utilização do hipoclorito de sódio a 10 % (v/v) foi eficaz na eliminação de *Salmonella* (Gutiérrez-Alcántara et al., 2015). Assim, não existe uma comparação plausível, pois neste caso, o que pode ter levado à eficácia do ensaio pode ser a concentração de hipoclorito de sódio ser elevada ou também pode ser que *Salmonella* seja menos resistente aos tratamento com o hipoclorito de sódio e ser mais facilmente eliminado, pois, observa-se que a AMUKINA a 2 % não foi eficaz na eliminação dos isolados de *A. butzleri*.

Também, Silveira et al. (2017) analisaram cinco indústrias de vegetais no processo de lavagem e no processo de desinfecção (imersão em hipoclorito de sódio) na redução de *Salmonella enteritides* e constataram que todas as indústrias tiveram reduções muito significativas, ou seja, entre 4,41 log UFC/mL a 5,83 log UFC/mL (Silveira et al., 2017). Só a etapa de lavagem diminuiu significativamente a população de *Salmonella* em alface, sendo a redução de aproximadamente 1 log UFC/g. A desinfecção realizada com hipoclorito de sódio 200 ppm foi capaz de reduzir 1 a 3 log UFC/g, dependendo do tempo de imersão utilizado. Por outro lado, enxaguar com água potável foi o último procedimento e foi adotado por todas as indústrias, onde esta etapa proporcionou reduções entre 0,12 log UFC/g a 1,90 log UFC/mL (Silveira et al., 2017). Contudo, após todo o procedimento (lavagem, desinfecção e enxaguamento) a indústria 5 apresentou uma redução na população de *Salmonella enteritides* de 4,42 log UFC/g, devido à imersão de alface diretamente em 200 ppm de hipoclorito de sódio por 5 minutos. A indústria 2 e a indústria 1 apresentaram reduções semelhantes na população de *Salmonella enteritides*, isto é, 4,48 e 4,49 log UFC/g, respetivamente. A indústria 4 reduziu 5,11 log UFC/g e o método mais eficaz foi demonstrado pela indústria 3 que utilizou lavagem seguida de desinfecção com imersão em 200 ppm de hipoclorito de sódio por 15 minutos correspondendo a 5,83 log UFC/g (Silveira et al., 2017). Porém, considerando apenas as reduções obtidas na etapa de desinfecção, não foram observadas diferenças estatísticas entre os procedimentos adotados pelas cinco indústrias investigadas. Assim, os autores deste estudo mostraram que a lavagem da alface com 200 mg/L de hipoclorito de sódio foi eficaz na eliminação de *Salmonella enteritidis*, isto é, este procedimento foi responsável por uma redução de aproximadamente 90 % da contaminação por *Salmonella enteritidis* (Silveira et al., 2017). Contudo, estes autores, demonstraram que *Salmonella* pode crescer até 8 log UFC/g em folhas de alface e o tratamento químico pode não garantir a destruição completa de contaminantes microbianos na superfície vegetal (Silveira et al., 2017). No entanto, apesar da concentração de hipoclorito de sódio utilizado pelos autores ter sido eficaz na eliminação de *Salmonella enteritidis* (Silveira et al., 2017), esta é diferente da

concentração que foi utilizada neste trabalho, logo, podemos concluir que dependendo das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, este pode ser eficaz ou não na eliminação de microrganismos.

Por outro lado, muitos estudos foram feitos em relação às condições de higienização e também aos processos de desinfecção utilizados nas indústrias e em matadouros. Assim, Rasmussen e seus colaboradores estudaram a tolerância dos biocidas em *A. butzleri*. No matadouro, a desinfecção é realizada com um biocida contendo NaClO a 5-15 %. A solução de trabalho do biocida é de 0,2 a 0,5 % correspondendo a 200-500 ppm de cloro ativo e o tempo de contacto é de aproximadamente 10 minutos. Os autores verificaram que a maioria de *Arcobacter spp.* foi inibido por este biocida contendo hipoclorito de sódio a uma concentração de 0,5 % correspondendo a 500 ppm de cloro ativo. No entanto, foi também observada a alta tolerância ao biocida de alguns isolados de *A. butzleri* obtidos no matadouro e os autores mostraram que *A. butzleri* pode sobreviver em concentrações de 0,5 % de NaClO, confirmando a presença de *Arcobacter* em duas amostras após o processo de higienização. Os dados obtidos levaram os autores a crer que no tempo de contacto de desinfecção de 10 minutos é provável que *A. butzleri* possa sobreviver à desinfecção. Isto sugere que há persistência e recontaminação contínua de *A. butzleri* em matadouros (Rasmussen et al., 2013). Assim, comparando o presente trabalho, com o trabalho de Rasmussen et al. (2013), ambos demonstraram a possível ineficácia de baixas concentrações de hipoclorito de sódio e baixos tempos de exposição na eliminação das bactérias, nomeadamente *A. butzleri*. Tal como observado neste estudo, também os autores Rasmussen et al. (2013) ao estudarem diferentes estirpes de *A. butzleri* verificaram que os perfis de suscetibilidade também eram diferentes (Rasmussen et al., 2013).

Em suma, na presença de matrizes alimentares ocorreu uma diminuição da atividade da temperatura, vinagre e AMUKINA na eliminação de *A. butzleri*, isto ocorreu, porque para estes tratamentos, as matrizes alimentares conferiram proteção na eliminação dos isolados de *A. butzleri*. Contudo, na presença de matrizes alimentares o vinagre foi mais eficaz que a AMUKINA, o contrário foi observado nos ensaios na ausência de matrizes alimentares.

## Capítulo 5: Conclusões

O género *Arcobacter* pertence à família *Campylobacteriaceae*, incluindo um grupo heterogéneo que compreende 30 espécies reconhecidas. De entre estas, *A. butzleri* tem sido descrita como a quarta espécie mais comum em amostras diarreicas entre as *Campylobacter-like organisms*, encontrando-se na lista de microrganismos considerados um perigo grave para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos.

Neste trabalho começou por ser avaliada a sobrevivência de isolados de *A. butzleri* na ausência de matrizes alimentares em três condições de stress (temperatura de 55 °C, vinagre 15 % (V/V) e AMUKINA 2% (V/V)). Tendo-se constatado que aquando da aplicação do tratamento térmico verificou-se uma redução no log UFC/mL, ou seja, observou-se uma redução de cerca de 4 log UFC/mL para todas as estirpes, mas, no entanto, não houve redução a níveis indetetáveis de *A. butzleri*. Por outro lado, quando se aplicou o vinagre e a AMUKINA estes levaram à eliminação de *A. butzleri*, tendo em conta que a AMUKINA foi mais eficaz que o vinagre. Sendo assim, na ausência de matrizes alimentares, a temperatura de 55 °C, o vinagre e a AMUKINA mostraram ser eficazes na eliminação de *A. butzleri*. Portanto, na ausência de matrizes alimentares a desinfecção, pode ser feita com o vinagre por pelo menos 1 minuto ou com a AMUKINA por pelo menos 30 segundos. Alguns isolados de *A. butzleri* também podem ser eliminados por processamento térmico a 55 °C, no entanto, 15 minutos pode não ser o suficiente, indicando que a utilização de temperaturas subótimas pode representar um perigo para a saúde pública. Com a observação destes resultados também podemos concluir que em relação às estirpes de *A. butzleri* utilizadas neste trabalho, existem estirpes mais sensíveis do que outras, isto é, algumas estirpes de *A. butzleri* como é o exemplo da CR42-4 e a INSA2808 são aquelas que apresentam maior sensibilidade térmica, sensibilidade acídica e sensibilidade química, pois, quando foram sujeitas às três condições de stress o número de células chegou a níveis indetetáveis mais rapidamente.

Neste trabalho, também foi avaliada a sobrevivência dos isolados de *Arcobacter butzleri* na presença de matrizes alimentares. A carne de frango foi sujeita ao tratamento térmico e a alface *iceberg* foi sujeita ao tratamento com o vinagre e com a AMUKINA. Com isto, constatamos que na presença de matrizes alimentares estes tratamentos perdem eficácia para algumas estirpes de *A. butzleri*, ou seja, observou-se uma diminuição na atividade da temperatura, vinagre e AMUKINA na morte desta bactéria. Assim, com a observação dos resultados, também verificamos que globalmente em relação às estirpes de *A. butzleri* utilizadas neste trabalho laboratorial, estas não foram reduzidas a níveis indetetáveis por estes tratamentos. Em relação, ao tratamento térmico na presença de carne de frango, esta

conferiu proteção na eliminação dos isolados de *A. butzleri*, o que era expectável por esta ser uma matriz rica em gordura, minerais e proteínas. Por outro lado, o tratamento ácido e o tratamento químico na presença de alface *iceberg*, também conferiu proteção na eliminação dos isolados de *A. butzleri*. O baixo número inicial de células neste ensaio, deveu-se à incubação da matriz e do inóculo a 4 °C durante 24 horas e isto levou à perda de viabilidade celular nestes dois ensaios. Portanto, a fim de evitar que produtos alimentícios sejam veículos de transmissão desses microrganismos, a desinfecção destes produtos alimentares, pode ser feita com o vinagre por pelo menos 5 minutos ou com a AMUKINA por pelo menos 5 minutos na presença de matrizes alimentares, sendo que estes tempos de exposição não são eficazes para todos os isolados de *A. butzleri*. Alguns isolados de *A. butzleri* também podem ser eliminados de produtos alimentares por processamento térmico a 55 °C, no entanto 30 minutos pode não ser o suficiente, indicando que a utilização de temperaturas subótimas na confeção de alimentos pode representar um perigo para o consumidor nos processos de processamento alimentar. Sendo assim, temperaturas iguais ou acima de 55 °C e tempos de exposição acima de 30 minutos podem levar à eliminação de *A. butzleri* e assim diminuir o perigo para o consumidor.

Desta forma, podemos concluir que apesar de a temperatura de 55°C, o vinagre e AMUKINA se mostrarem eficazes na eliminação de *A. butzleri* na ausência de matrizes alimentares, quando aplicadas na presença das matrizes alimentares estudadas (frango e alface) verificou-se uma redução da sua eficácia, o que indica que estas matrizes alimentares influenciam os processos de processamento alimentar e os processos de higienização, o que poderá representar um potencial perigo para os consumidores.

Em suma, o presente trabalho permitiu uma melhor compreensão acerca da capacidade de sobrevivência de *A. butzleri* a condições de stress associada ao processamento alimentar e às condições de higienização.

## Perspetivas Futuras

Considerando o estudo que foi realizado em relação à capacidade de sobrevivência de *A. butzleri* quando sujeito a condições de stress, era interessante que mais estudos fossem feitos em relação a este tema, como por exemplo:

- Estudar o efeito das condições de stress em outras estirpes de *Arcobacter butzleri*;
- Em relação ao stress térmico, outras temperaturas e outros tempos devem ser aplicados;
- Estudar outras concentrações de vinagre e AMUKINA, bem como outros tempos de exposição;
- Estudar a capacidade de sobrevivência das estirpes de *A. butzleri* na passagem do sistema gastrointestinal.

Este último ponto é importante porque seria um bom ponto de partida para entender se este microrganismo pode atingir o intestino e talvez causar infeção. Por outro lado, muito pouco se sabe acerca da capacidade de sobrevivência de *A. butzleri* no trato gastrointestinal, sendo esta capacidade um evento chave para a sua robustez no Homem, enquanto hospedeiro e o seu potencial patogénico.



## Referências bibliográficas

Amare, L. B., Saleha, A. A., Zunita, Z., Jalila, A., & Hassan, L. (2011). "Prevalence of *Arcobacter spp.* on chicken meat at retail markets and in farm chickens in Selangor, Malaysia." *Food Control*, 22 (5): 732-736.

Andersen, M. M. E., Wesley, I. V., Nestor, E., & Trampel, D. W. (2007). "Prevalence of *Arcobacter* species in market-weight commercial turkeys." *Antonie van Leeuwenhoek*, 92: 309-317.

Balamurugan, S., Ahmed, R., & Chambers, J. R. (2013). "Survival of *Arcobacter butzleri* on vacuum packaged chill stored beef." *Food Research International*, 52 (2): 503-507.

Bogantes, E. V., Fallas-Padilla, K. L., Rodríguez-Rodríguez, C. E., Jaramillo, H. F., & Echandi, M. L. A. (2015). "Zoonotic species of the genus *Arcobacter* in poultry from different regions of Costa Rica." *Journal of Food Protection*, 78 (4): 808-811.

Callbeck, C. M., Pelzer, C., Gaute, L., Ferdelman, T. G., Graf, J. S., Vekeman, B., Schunck, H., Littman, S., Fuchs, B. M., Hach, P.F., Kalvelage, T., Schmitz, R. A. & Kuypers, M. M. M. (2019). "*Arcobacter peruensis* sp.nov., a chemolithoheterotroph isolated from sulfide and organic rich coastal waters off Peru." *Applied and Environmental Microbiology* (In press)

Campos, A., Lopes, M. S., Carvalheira, A., Barbosa, J., & Teixeira, P. (2019). "Survival of clinical and food *Acinetobacter spp.* isolates exposed to different stress conditions." *Journal Of Food Microbiology*, 77: 202-207.

Cervenka, L. (2008). "Survival and inactivation of *Arcobacter spp.*, a current status and future prospect survival and inactivation of *Arcobacter spp.*." *Current Critical Reviews in Microbiology*, 33 (2): 101-108.

Cervenka, L., Malíková, Z., Zachová, I., & Vytěšová, J. (2004). "The effect of acetic acid, citric acid, and trisodium citrate in combination with different levels of water activity on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture." *Folia Microbiologica*, 49 (1): 8-12.

Cervenka, L., Zachová, I., Minariková, P., & Vytrasová, J. (2003). "Effect of pH and water activity on the growth of *Arcobacter sp.* in culture." *Journal Food Science*, 21 (6): 203-209.

Collado, L., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2009). "Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish." *Journal of Food Protection*, 72 (5): 1102-1106.

Collado, L., Inza, I., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2008). "Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution" *Environmental Microbiology*, 10: 1635-1640. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01555.x>

Collado, L., & Figueras, M. J. (2011). "Taxonomy , epidemiology , and clinical relevance of the genus *Arcobacter*." *Clinical Microbiology Reviews*, 24 (1): 174-192.

Collado, L., Kasimir, G., Perez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., Huget, J. M. & Figueras, M. J. (2010). Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the llobregat river catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant. *Water Research*, 44 (12): 3696-3702.

D'Sa, E. M., & Harrison, M. A. (2005). "Effect of pH, NaCl content, and temperature on growth and survival of *Arcobacter* spp.." *Journal of Food Protection*, 68 (1): 18-25.

Degeer, S. L., Wang, L., Hill, G. N., Singh, M., Bilgili, S. F., & Bratcher, C. L. (2016). "Optimizing application parameters for lactic acid and sodium metasilicate against pathogens on fresh beef, pork and deli meats." *Meat Science*, 118: 28-33.

Driessche, E. Van, & Houf, K. (2008). "Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions." *Journal of Applied Microbiology*, 105: 443-451.

Driessche, E. Van, Houf, K., Vangroenweghe, F., Nollet, N., Zutter, L. De, Vandamme, P., & Hoof, J. Van. (2004). "Occurrence and strain diversity of *Arcobacter* species isolated from healthy Belgian pigs." *Research in Microbiology*, 155: 662-666.

Durek, J., Khozroughi, A. G., Fröhling, A., Schlüter, O., Knorr, F., Mader, A., Goodarzi Boroojeni, F., Zentek, J., Knorr, D. & Bolling, J. S. (2014). "Effects of thermally treated broiler feed with different organic acid levels on resulting meat composition and parameters related to meat quality." *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 26: 397-405.

Faccini dos Santos, F., Cosendey de Aquino, M. H., Abreu, D. L., do Nascimento, E. R., & Pereira, V. L. (2012). "*Arcobacter* spp. e saúde coletiva: um patógeno emergente." *Enciclopédia Biosfera*, 8 (15): 1931-1944.

Ferreira, E. A. M. (2009). *Avaliação de diferentes tratamentos de desinfecção de alface: uma abordagem química e toxicológica*. Tese de Mestrado em Alimentação coletiva. Faculdade de Ciências da nutrição e alimentação- Universidade do Porto, Porto. 101 pp.

Ferreira, S., Correia, D. R., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2018). "*Arcobacter butzleri* Ciprofloxacin resistance: point mutations in DNA Gyrase A and role on fitness cost." *Microbial Drug Resistance*, 24 (7): 1-8.

- Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., & Oleastro, M. (2013). "Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse." *International Journal of Food Microbiology*, 162 (1): 82-88.
- Ferreira, S., Oleastro, M., & Domingues, F. (2017). "*Arcobacter spp* . in Food Chain - From Culture to Omics." In *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*, Edited by Om V. Singh, First Edit, New York 73-177.
- Ferreira, S., Oleastro, M., & Domingues, F. (2019). "Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain." *Current opinion in food science*, 26: 9-17.
- Ferreira, S., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2017). "Occurrence , genetic diversity and antibiotic resistance of *Arcobacter sp* . in a dairy plant." *Journal of Applied Microbiology*, 123: 1019-1026.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2016). "Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter* : A review." *Critical Reviews in Microbiology*, 7828 (3): 364-383.
- Figueras, M. J., Collado, L., Levican, A., Perez, J., Solsona, M. J., & Yustes, C. (2011). "*Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish." *Systematic and Applied Microbiology*, 34: 105-109.
- Giacometti, F., Losio, M. N., Daminelli, P., Dalzini, E., & Serraino, A. (2015). "Survival and growth in artisanal and industrial ricotta cheese." *Journal of Dairy Science*, 98 (10): 6776-6781.
- Giacometti, F., Lucchi, A., Manfreda, G., Florio, D., & Zanoni, G. (2013). "Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* in an artisanal dairy plant in Italy." *Applied And Environmental Microbiology*, 79 (21): 6665-6669.
- Gurman, P. M., Ross, T., Holds, G. L., Jarrett, R. G., & Kiermeier, A. (2016). "Thermal inactivation of *Salmonella spp* . in pork burger patties." *International Journal of Food Microbiology*, 219: 12-21.
- Gutiérrez-Alcántara, E. J., Rangel-Vargas, E., Gómez-Aldapa, C. A., Falfan-Cortes, R. N., Rodríguez-Marín, M. L., Godínez-Oviedo, A., Cortes-López, H. & Castro-Rosas, J. (2015). "Antibacterial effect of roselle extracts ( *Hibiscus sabdariffa* ), sodium hypochlorite and acetic acid against multidrug-resistant *Salmonella* strains isolated from tomatoes." *Letters in Applied Microbiology*, 62: 177-184.
- Hausdorf, L., Neumann, M., Bergmann, I., Sobiella, K., Mundt, K., Fröhling, A., & Klocke, M.

(2013). "Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp . in a spinach-processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays." *Systematic and Applied Microbiology*, 36 (4): 235-243.

Hilton, C. L., Mackey, B. M., Hargreaves, A. J., & Forsythe, S. J. (2001). "The recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from various temperature treatments." *Journal of Applied Microbiology*, 1: 929-932.

Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., & Gastra, W. (2008). "The introduction of *Arcobacter* spp . in poultry slaughterhouses." *International Journal of Food Microbiology*, 125: 223-229.

Hsu, T. D., & Lee, J. (2015). "Global distribution and prevalence of *Arcobacter* in food and water." *Zoonoses and Public Health*, 62: 579-589.

Huang, J., Luo, Y., Zhou, B., Zheng, J., & Nou, X. (2019). "Growth and survival of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce and their juice extracts: Impacts and interactions of food matrices and temperature abuse conditions." *Food Control*, 100: 300-304.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2002. *Microorganisms in Food. 7 - Microbiological Testing in Food Safety Management*. Springer Science and Business Media.

Isohanni, P., Huehn, S., Aho, T., Alter, T., & Lyhs, U. (2013). "Heat stress adaptation induces cross-protection against lethal acid stress conditions in *Arcobacter butzleri* but not in *Campylobacter jejuni*." *Food Microbiology*, 34 (2): 431-435.

Juneja, V. K., Eblen, B. S., & Ransom, G. M. (2001). "Thermal inactivation of *Salmonella* spp . in chicken broth , beef , pork , turkey , and chicken: determination of D- and Z-values." *Food Microbiology and Safety*, 66 (1): 146-152.

Juneja, V. K., Marks, H. M., & Mohr, T. (2003). "Predictive thermal inactivation model for effects of temperature, sodium lactate, NaCl, and sodium pyrophosphate on *Salmonella* serotypes in ground beef." *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9): 5138-5156.

Jyothsna, T. S. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V, Sasikala, C., & Ramana, C. V. (2013). "*Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (63): 4619-4625.

Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. O. N. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G., & Wachsmuth, I. K. (1991). "*Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness." *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (2): 376-385.

- Kim, Y., Choi, Y., Kim, S., Park, J., Chung, M., Song, K. B., Hwang, I., Kwon, K., & Park, J. (2009). "Disinfection of iceberg lettuce by titanium dioxide - UV photocatalytic reaction." *Journal of Food Protection*, 72 (9): 1916-1922.
- Kjeldgaard, J., Jørgensen, K., & Ingmer, H. (2009). "Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*." *International Journal of Food Microbiology*, 131 (2-3): 256-259.
- Lappi, V., Archer, J. R., Cebelinski, E., Leano, F., Besser, J. M., Klos, R. F., Medus, C., Smith, K. E., Fitzgerald, C. & Davis, J. P. (2013). "An outbreak of foodborne illness among attendees of a wedding reception in Wisconsin likely caused by *Arcobacter butzleri*." *Foodborne Pathogens and Disease*, 10 (3): 250-255.
- Lee, M. H., & Choi, C. (2013). "Survival of *Arcobacter butzleri* in apple and pear purees." *Journal of Food Safety*, 33: 333-339.
- Lehner, A., Tasara, T., & Stephan, R. (2005). "Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen." *International Journal of Food Microbiology*, 102: 127-135.
- Levican, A., Collado, L., & Figueras, M. J. (2016). "The use of two culturing methods in parallel reveals a high prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in a wastewater treatment plant." *Biomed Research International*, 2016: 1-9.
- Levican, A., Collado, L., & José, M. (2013). "*Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage." *Systematic and Applied Microbiology*, 36 (1): 22-27.
- Mild, R. M., Joens, L. A., Friedman, M., Olsen, C. W., Mchugh, T. H., Law, B., & Ravishankar, S. (2011). "Antimicrobial edible apple films inactivate antibiotic resistant and susceptible *Campylobacter jejuni* strains on chicken breast." *Journal of Food Science*, 76 (3).
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, L., Ferru, M. A., Herna, M., & Herna, J. (2003). "Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization." *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2): 1181-1186.
- Olmez, H., & Kretzschmar, U. (2009). "Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact." *LWT - Food Science and Technology*, 42 (3): 686-693.
- Pérez-Cataluña, A., Salas- Massó, N., & Figueras, M. J. (2018). "*Arcobacter canalis* sp. nov., isolated from a water canal contaminated with urban sewage." *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1258-1264.

Pérez-cataluña, A., Salas-massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., & Bowman, J. P. (2018). "Revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: getting order from the chaos." *Frontiers in Microbiology*, 9.

Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., & Figueras, M. J. (2018). "*Arcobacter lacus* sp. nov. and *Arcobacter caeni* sp. nov., two novel species isolated from reclaimed water." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69 (11): 1-6.

Pinto, T. M. S. (2006). *Vinagre como agente antimicrobiano no controle de Candida spp. em protadores de protese total*. Tese de mestrado em Odontologia. Universidade de Taubaté. 81 pp.

Prudêncio, C. V., Santos, M. T., & Vanetti, M. C. D. (2015). "Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology." *Journal Food Science Technology*, 52 (9): 5408-5417.

Ramos, B., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2014). "Balsamic vinegar from Modena: An easy and effective approach to reduce *Listeria monocytogenes* from lettuce." *Food Control*, 42: 38-42.

Rasmussen, L. H., Kjeldgaard, J., Christensen, J. P., & Ingmer, H. (2013). "Multilocus sequence typing and biocide tolerance of *Arcobacter butzleri* from Danish broiler carcasses." *Biomed central Research*, 322: 0-6.

Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V, Johnson, C. H., & Tanner, S. A. (1999). "Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water." *Letters in Applied Microbiology*, 28: 31-35.

Serraino, A., & Giacometti, F. (2014). Short communication: "Occurrence of *Arcobacter* species in industrial dairy plants." *Journal of Dairy Science*, 97 (4): 2061-2065.

Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Murugaiyah, M., Aliyu, A. B., & Jafri, N. (2013). "Prevalence, distribution and antibiotic resistance of emergent *Arcobacter* spp. from clinically healthy cattle and goats." *Transboundary and Emerging Diseases*, 60: 9-16.

Shin, J., Lee, S., Dougherty, R. H., Rasco, B., & Kang, D. (2006). "Combined effect of mild heat and acetic acid treatment for inactivating *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in an asparagus puree." *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1140-1151.

Silveira, J. B., Hessel, C. T., & Tondo, E. C. (2017). "Inactivation of *Salmonella enteritidis* on lettuces used by minimally processed vegetable industries." *Journal of Infection in Developing Countries*, 11 (1): 34-41.

- Skrivanová, E., Molatová, Z., Matenová, M., Houf, K., & Marounek, M. (2011). "Inhibitory effect of organic acids on *Arcobacters* in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on chicken skin." *Journal Of Food Microbiology*, 144: 367-371.
- Vandamme, P., Vanvanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., Van Den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Butzler, J.P., & Goossens, H. (1992). "Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens, 7: 344-356.
- Vicente-Martins, S., Oleastro, M., Domingues, F. C., & Ferreira, S. (2018). "*Arcobacter* spp . at retail food from Portugal: Prevalence , genotyping and antibiotics resistance." *Food Control*, 85: 107-112.
- Waite, D. W., Vanwonterghem, I., Rinke, C., Parks, D. H., Zhang, Y., Takai, K., Sievert, S. M., Simon, J., Campbell, B. J., Hanson, T. E., Woyke, T., Klotz, M. G., & Hugenholtz, P. (2017). "Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to *Epsilonbacteraeota* (phyl. nov.)." *Frontiers in Microbiology*, , 8(4).
- Wesley, I. V, Wells, S. J., Harmon, K. M., Green, A., Schroeder-Tucker, L., Glover, M., & Siddique, I. (2000). "Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle." *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5): 1994-2000.
- Yan, J. J., Ko, W. C., Huang, A. H., Chen, H. M., Jin, Y. T., & Wu, J. J. (2000). "*Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis." *Journal of the Formosan Medical Association*, 99 (2): 166–169.



# Anexos



## CERTIFICADO

Certifica-se que **Carolina Batista, Fernanda Domingues e Susana Ferreira** apresentaram um poster com o título «**Sobrevivência de *Arcobacter butzleri* quando sujeito a condições de stress**» nas **IV Jornadas de Educação e Investigação em Saúde** realizadas no dia 12 de dezembro de 2019, na Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico da Guarda.

Guarda, 12 de dezembro de 2019

A Diretora da Escola Superior de Saúde

(Prof. Paula Pissarra)

A Presidente do Conselho Pedagógico

(Prof. Doutora Ermelinda Marques)

