



Instituto Politécnico de Leiria

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche

*Avaliação da Qualidade e Segurança Microbiológica de  
Hortofrutícolas*

Mariana Gaspar Carlos

2014



Instituto Politécnico de Leiria

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche

*Avaliação da Qualidade e Segurança Microbiológica de  
Hortofrutícolas*

Mariana Gaspar Carlos

Dissertação para obtenção do Grau Mestre em Gestão da Qualidade e Segurança  
Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Maria Manuel Sampaio  
Cristovão

2014

Titulo: Avaliação da Qualidade e Segurança Microbiológica de Hortofrutícolas

Copyright © Mariana Gaspar Carlos

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2014

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

Expresso aqui os meus agradecimentos sinceros às pessoas que direta e indiretamente colaboraram na elaboração deste trabalho.

- À minha família por me ter dado a oportunidade para concretizar esta etapa.
- À minha orientadora, Doutora Maria Manuel Sampaio, que sempre me deu ânimo e incentivo para continuar, mesmo quando algo não corria da melhor forma. Pelo ensinamento, dedicação e permanente disponibilidade demonstrada ao longo de todo este processo.
- À Doutora Susana Mendes pela ajuda no tratamento estatístico do presente trabalho e disponibilidade demonstrada.
- A todas as pessoas que perderam algum do seu tempo a participar neste estudo através do preenchimento do inquérito.



## Resumo

Frutas e vegetais frescos, embora sejam essenciais para uma dieta equilibrada e nutritiva, estão frequentemente associados a surtos de origem alimentar, pois este tipo de produto é muitas vezes consumidos cru, sem qualquer processamento térmico que elimine ou reduza para níveis aceitáveis a carga microbiana patogénica. Desta forma, e para que o consumo deste tipo de produtos continue a aumentar, torna-se importante aumentar o controlo em termos de segurança alimentar em todas as fases de produção.

O presente trabalho de investigação teve por objetivos estudar a ocorrência de cinco microrganismos patogénicos: *Salmonella* sp.; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; HAV (vírus da Hepatite A), em framboesas e alface à venda no mercado português, otimizando uma técnica simples e rápida para deteção desses microrganismos nesses produtos. Também neste trabalho foi feito um estudo sobre os hábitos de consumo de produtos minimamente processados, framboesas e alface através de um inquérito por questionário.

A escolha dos produtos e microrganismos a pesquisar teve por base um levantamento de quais as contaminações e os hortofrutícolas mais afetados nos últimos anos.

A investigação iniciou-se com a pesquisa do HAV em framboesas e alface, onde após uma revisão bibliográfica, foram testados quatro protocolos distintos. No entanto devido à complexidade das técnicas para pesquisa de vírus em alimentos, à falta de meios e controlos para o desenvolvimento das respetivas técnicas, este objetivo foi abandonado.

Numa segunda fase foi otimizado um método de deteção (PCR) para pesquisa das bactérias patogénicas, igualmente em framboesas e alface.

Após otimização das condições de PCR, foram testados dois métodos de preparação da amostra: um com um passo de rebenamento de células baseado na fervura; e outro onde apenas se recolheu algum volume de cultura de pré-enriquecimento, tendo-se usado a mesma diretamente para a reação de PCR.

Concluiu-se que apenas o primeiro método é eficiente, mas apenas para bactérias Gram-negativas (*Salmonella* sp. e *E. coli*) uma vez que estas possuem uma parede celular fina, capaz de ser destruída pela fervura, ao contrário das Gram-positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*).

Das amostras de framboesas e alface à venda no mercado português analisadas, concluiu-se que, apesar do método ainda necessitar de alguns ajustes, apenas a amostra de alface fresca parece não apresentar qualquer contaminação com *Salmonella* sp. e *E. coli*. Para *S. aureus* e *L. monocytogenes* não foi possível obter conclusões definitivas quanto à sua presença nas amostras analisadas, já que vários testes de confirmação deverão ser repetidos.

Relativamente aos resultados obtidos acerca do inquérito de consumo, tem-se que dos 186 inquiridos, a grande maioria consome produtos hortofrutícolas minimamente processados 1-3 vezes/semana, tendo, a grande maioria, o hábito de os lavar com água antes do seu consumo, prática esta que é aconselhada.

Quanto ao consumo de alface, a frequência aumenta para 3-5 vezes/semana, sendo esta adquirida maioritariamente inteira fresca e em superfícies comerciais.

Por fim o consumo de framboesas ainda é escasso, pois a grande maioria dos inquiridos alega consumir este produto esporadicamente, sendo estas adquiridas embaladas inteiras frescas em superfícies comerciais.

**Palavras-chave:** Frutas e vegetais, microrganismos patogénicos, deteção molecular, inquérito, Segurança Alimentar

## Abstract

Fresh fruits and vegetables, although essential to a balanced and nutritious diet, are often associated with foodborne outbreaks, as this type of product is often consumed raw, without any thermal processing to eliminate or reduce to acceptable levels the pathogenic microbial load. This way, for the consumption of such products to continue to enlarge, it becomes important to increase control in terms of food safety at all stages of production.

This research work aimed to study the occurrence of five pathogens: *Salmonella* sp.; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; HAV (Hepatitis A), in raspberries and lettuce on sale in the Portuguese market, optimizing a simple and rapid technique for detection of these microorganisms in these products. Also in this thesis a study on the consumption habits of minimally processed products, raspberries and lettuce was done through a questionnaire survey.

The choice of products and microorganisms used in this research was based on a survey which refers what are the contaminations that most affected fruits and vegetables in recent years.

The research began with a survey of HAV on lettuce and raspberries, where after a literature review, four different protocols were tested. However due to the complexity of the techniques to search viruses in food, the lack of resources and controls for the development of the respective techniques, this goal was abandoned.

In a second stage the detection method optimized (PCR) for the presence of pathogenic bacteria, also in raspberries and lettuce.

After optimization of PCR conditions, two methods of sample preparation were tested: the first one involved a step that consisted on the bursting of cells through boiling; and the second one a method in which only one was collected culture volume of pre-enrichment, and the same is used directly for PCR.

It was concluded that only the first method of sample preparation was effective, but only for Gram-negative bacteria (*Salmonella* sp. and *E. coli*) as they have a thin cell wall, capable of being destroyed by boiling, in contrast to Gram-positive (*S. aureus* and *L. monocytogenes*).

Samples of raspberries and lettuce on sale in the Portuguese market were analyzed, it was concluded that, although the method still needs some tweaking, just a sample of fresh lettuce seems to show no contamination with *Salmonella* sp. and *E. coli*. For *S. aureus* and *L. monocytogenes* it was not possible to draw definite conclusions as to their presence in the samples, since several confirmatory tests should be repeated.

With regard to results on the consumer survey, we have that of the 186 answers, most consume minimally processed fruit products 1-3 times/week, with the vast majority having the habit of washing them with water before consumption, a practice which is advised.

Regarding the consumption of lettuce, the frequency increases to 3-5 times/week, vegetable which is acquired mainly fresh whole and in retail outlets.

Finally the consumption of raspberries is still scarce, because the vast majority of respondents claimed to consume this product sporadically, which are acquired fresh packaged whole in supermarkets.

**Key-words:** Fruits and vegetables, pathogenic microorganisms, molecular detection, inquiry, Food Security

## Índice Geral

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>iii</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos .....</b>	<b>xvii</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Comercialização e consumo de hortofrutícolas em Portugal.....	3
1.2. Qualidade e Segurança Alimentar de produtos hortofrutícolas .....	5
1.2.1. Qualidade Alimentar.....	6
1.2.2. Segurança Alimentar .....	7
1.2.2.1. Principais Microrganismos.....	9
1.2.2.2. Mecanismos de contaminação e prevenção .....	16
1.2.3. Epidemiologia.....	20
1.3. Métodos de deteção de microrganismos .....	24
1.3.1. Métodos de deteção de vírus da hepatite A em hortofrutícolas.....	24
1.3.2. Métodos de deteção de bactérias patogénicas em produtos frescos .....	27
1.3.3. Técnica Molecular de PCR.....	28
1.3.3.1. Princípios e funcionamento .....	28
1.3.3.2. Condições que afetam o sucesso do PCR .....	30
1.3.3.3. Preparação da amostra.....	31
1.3.3.4. Eletroforese em Gel de Agarose.....	32
1.4. Objetivos do trabalho .....	33
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>35</b>
2.1. Deteção de hepatite A em framboesas e alface.....	35
2.2. Deteção de bactérias patogénicas em framboesas e alface .....	36

2.2.1.	Preparação da amostra .....	36
2.2.2.	Reagentes, <i>primers</i> e condições de PCR utilizadas.....	37
2.2.3.	Eletroforese em gel de agarose.....	38
2.2.4.	Otimização do método de deteção.....	39
2.3.	Inquérito de consumo alimentar .....	46
2.3.1.	Definição da Amostra.....	46
<b>3.</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>49</b>
3.1.	Deteção de hepatite A em framboesas e alface.....	49
3.2.	Otimização do método de deteção .....	50
3.2.1.	Quantificação do ADN genómico extraído dos microrganismos com recurso a um kit comercial.....	50
3.2.2.	Pureza e eficiência dos reagentes utilizados no PCR .....	51
3.2.3.	Especificidade dos <i>primers</i> usados.....	54
3.2.4.	Sensibilidade dos <i>primers</i> para diferentes concentrações de ADN dos diferentes microrganismos .....	57
3.2.5.	Extração de ADN de framboesas e alface com recurso a um kit comercial..	60
3.2.6.	Sensibilidade do método de deteção usado, variando a concentração “adicionada” de microrganismos .....	61
3.3.	Análise de amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português .....	68
3.4.	Análise descritiva dos resultados do questionário .....	71
<b>4.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>78</b>
4.1.	Limitações do estudo .....	86
<b>5.</b>	<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>88</b>
<b>Anexos.....</b>		<b>96</b>
Anexo I .....		96
Anexo II .....		100

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1:</b> Comparação entre as recomendações diárias de consumo de cada grupo da roda dos alimentos e o que acontece na realidade. Dados de 2012 (INE, 2014).....	2
<b>Figura 1.2:</b> Desequilíbrio das disponibilidades dos grupos alimentares face ao recomendado em 2012 (INE, 2014). .....	5
<b>Figura 1.3:</b> Evolução de alguns dos marcadores da infeção pelo vírus da hepatite A. Sintomas, aspetos imunológicos e biológicos (Canas e Sousa, 2002).....	14
<b>Figura 1.4:</b> Mecanismos pelos quais frutas e vegetais frescos podem ser contaminados com microrganismos patogénicos (WHO/FAO, 1998; Martín-Belloso e Soliva-Fortuny, 2011).....	17
<b>Figura 1.5:</b> Patogénicos com mais notificações em frutas e vegetais em 2012 e 2013 (RASFF, 2013). .....	20
<b>Figura 1.6:</b> Ilustração dos ciclos de PCR. D – <i>Desnaturation</i> ; A – <i>Annealing</i> ; E – <i>Extension</i> (Joshi, 2010). .....	29
<b>Figura 2.1:</b> Marcador de pesos moleculares usado. ....	38
<b>Figura 2.2:</b> Procedimento realizado para o teste à sensibilidade do método de deteção usado, variando a concentração “adicionada” de microrganismos.....	42
<b>Figura 2.3:</b> Procedimento realizado para análise de amostras de framboesas e alface à venda no mercado português. ....	45
<b>Figura 3.1:</b> Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes ao teste de pureza e eficiência dos reagentes utilizados no PCR para deteção de <i>Salmonella</i> sp., em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 - SLneg1 (ausência de <i>primer reverse</i> ); 2 – SLneg2 (ausência de <i>primer forward</i> ); 3 – SLneg3 (sem <i>Taq</i> DNA polimerase); 4 – SLpos (reação teste, com todos os reagentes).....	51
<b>Figura 3.2:</b> Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes ao teste de pureza e eficiência dos reagentes utilizados no PCR para deteção de <i>Escherichia coli</i> , em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 - ECneg1 (ausência de <i>primer reverse</i> ); 2 – ECneg2 (ausência de <i>primer forward</i> ); 3 – ECneg3 (sem <i>Taq</i> DNA polimerase); 4 – ECpos (reação teste, com todos os reagentes).....	52
<b>Figura 3.3:</b> Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes ao teste de pureza e eficiência dos reagentes utilizados no PCR para deteção de <i>Staphylococcus aureus</i> , em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 - SANeg1 (ausência de <i>primer reverse</i> ); 2 – SANeg2 (ausência de <i>primer forward</i> ); 3 – SANeg3 (sem <i>Taq</i> DNA polimerase); 4 – SApos (reação teste, com todos os reagentes).....	53
<b>Figura 3.4:</b> Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes ao teste de pureza e eficiência dos reagentes utilizados no PCR para a deteção de <i>Listeria monocytogenes</i> , em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 - LTneg1 (ausência de	

*primer reverse*); 2 – LTneg2 (ausência de *primer forward*); 3 – LTneg3 (sem *Taq DNA* polimerase); 4 – LTpos (reação teste, com todos os reagentes). ..... 53

**Figura 3.5:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da especificidade dos *primers* usados na detecção de *Salmonella* sp., em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – ADN molde: *S. aureus*; 2 – ADN molde: *L. monocytogenes*; 3 – ADN molde: *E. coli*; 4 – ADN molde: *Salmonella* sp..... 54

**Figura 3.6:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da especificidade dos *primers* usados na detecção de *E. coli*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – ADN molde: *S. aureus*; 2 – ADN molde: *L. monocytogenes*; 3 – ADN molde: *E. coli*; 4 – ADN molde: *Salmonella* sp..... 55

**Figura 3.7:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da especificidade dos *primers* usados na detecção de *S. aureus*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – ADN molde: *Salmonella* sp.; 2 – ADN molde: *L. monocytogenes*; 3 – ADN molde: *E. coli*; 4 – ADN molde: *S. aureus*. ..... 56

**Figura 3.8:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da especificidade dos *primers* usados na detecção de *Listeria monocytogenes*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – ADN molde: *S. aureus*; 2 – ADN molde: *L. monocytogenes*; 3 – ADN molde: *E. coli*; 4 – ADN molde: *Salmonella* sp..... 57

**Figura 3.9:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da sensibilidade dos *primers* a diferentes concentrações de ADN de *Salmonella* sp., em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – [ADN]: C; 2 – [ADN]: C/5; 3 – [ADN]: C/10; 4 – [ADN]: C/15; 5 – [ADN]: C/20; 6 – [ADN]: C/25..... 58

**Figura 3.10:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da sensibilidade dos *primers* a diferentes concentrações de ADN de *Escherichia coli*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – [ADN]: C; 2 – [ADN]: C/5; 3 – [ADN]: C/10; 4 – [ADN]: C/15; 5 – [ADN]: C/20; 6 – [ADN]: C/25..... 59

**Figura 3.11:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da sensibilidade dos *primers* a diferentes concentrações de ADN de *Staphylococcus aureus*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – [ADN]: C; 2 – [ADN]: C/5; 3 – [ADN]: C/10; 4 – [ADN]: C/15; 5 – [ADN]: C/20; 6 – [ADN]: C/25..... 59

**Figura 3.12:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da sensibilidade dos *primers* a diferentes concentrações de ADN de *Listeria monocytogenes*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – [ADN]: C; 2 – [ADN]: C/5; 3 – [ADN]: C/10; 4 – [ADN]: C/15; 5 – [ADN]: C/20; 6 – [ADN]: C/25..... 60

**Figura 3.13:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de framboesas, variando a concentração “adicionada” de *Salmonella* sp., em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl; sem fervura das amostras: 6 – sem inoculo; 7 – 50µl; 8 – 100µl; 9 – 150µl; 10 – 200µl. 11 – Controlo positivo; 12 – Controlo negativo. .... 62

**Figura 3.14:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de alface, variando a concentração “adicionada” de *Salmonella* sp., em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl; sem fervura das amostras: 6 – sem inoculo; 7 – 50µl; 8 – 100µl; 9 – 150µl; 10 – 200µl. 11 – Controlo positivo; 12 – Controlo negativo. .... 62

**Figura 3.15:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de framboesas, variando a concentração “adicionada” de *Escherichia coli*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inóculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl. 6 – Controlo positivo; 7 – Controlo negativo. Sem fervura das amostras: 8 – sem inoculo; 9 – 50µl; 10 – 100µl; 11 – 150µl; 12 – 200µl. .... 63

**Figura 3.16:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de alface, variando a concentração “adicionada” de *Escherichia coli*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl. Sem fervura das amostras: 7 – sem inoculo; 8 – 50µl; 9 – 100µl; 10 – 150µl; 11 – 200µl. .... 64

**Figura 3.17:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de framboesas, variando a concentração “adicionada” de *Staphylococcus aureus*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl. 6 – Controlo positivo; 7 – Controlo negativo. Sem fervura das amostras: 8 – sem inoculo; 9 – 50µl; 10 – 100µl; 11 – 150µl; 12 – 200µl. .... 65

**Figura 3.18:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes á avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de alface, variando a concentração “adicionada” de *Staphylococcus aureus*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl; sem fervura das amostras: 6 – sem inoculo; 7 – 50µl; 8 – 100µl; 9 – 150µl; 10 – 200µl. .... 65

**Figura 3.19:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de framboesas, variando a concentração “adicionada” de *Listeria monocytogenes* inoculada em amostras de framboesas, em que: M – Marcador de pesos moleculares; sem fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl; com fervura das amostras: 6 – sem inoculo; 7 – 50µl; 8 – 100µl; 9 – 150µl; 10 – 200µl. 11 – Controlo positivo; 12 – Controlo negativo. .... 66

**Figura 3.20:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de alface, variando a concentração “adicionada” de *Listeria monocytogenes* inoculada em amostras de framboesas, em que: M – Marcador de pesos moleculares; sem fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl; com fervura das amostras: 6 – sem inoculo; 7 – 50µl; 8 – 100µl; 9 – 150µl; 10 – 200µl. 11 – Controlo positivo; 12 – Controlo negativo. .... 66

<b>Figura 3.21:</b> Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da análise quanto à presença de <i>Salmonella</i> sp. em amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com <i>Taq</i> DNA polimerase: 1 – amostra A; 2 – amostra B; 3 – amostra C; 4 – amostra D; 5 – amostra E; 6 – amostra F; 7 – Controlo negativo; sem <i>Taq</i> DNA polimerase: 8 – amostra A; 9 – amostra B; 10 – amostra C; 11 – amostra D; 12 – amostra E; 13 – amostra F.....	68
<b>Figura 3.22:</b> Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da análise quanto à presença de <i>Escherichia coli</i> em amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com <i>Taq</i> DNA polimerase: 1 – amostra A; 2 – amostra B; 3 – amostra C; 4 – amostra D; 5 – amostra E; 6 – amostra F; 7 – Controlo negativo.....	69
<b>Figura 3.23:</b> Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da análise quanto à presença de <i>Staphylococcus aureus</i> em amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com <i>Taq</i> DNA polimerase: 1 – amostra A; 2 – amostra B; 3 – amostra C; 4 – amostra D; 5 – amostra E; 6 – amostra F; 7 – Controlo negativo. ....	70
<b>Figura 3.24:</b> Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da análise quanto à presença de <i>Listeria monocytogenes</i> em amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com <i>Taq</i> DNA polimerase: 1 – amostra A; 2 – amostra B; 3 – amostra C; 4 – amostra D; 5 – amostra E; 6 – amostra F; 7 – Controlo negativo. ....	71
<b>Figura 3.25:</b> Distribuição da amostra por faixa etária.....	72
<b>Figura 3.26:</b> Distribuição da amostra por grau de escolaridade.....	72
<b>Figura 3.27:</b> Consumo de hortofrutícolas minimamente processados pelos inquiridos.....	73
<b>Figura 3.28:</b> Frequência com que os inquiridos consomem produtos frescos minimamente processados.....	73
<b>Figura 3.29:</b> Produto de desinfecção habitualmente utilizado pelos inquiridos. ....	74
<b>Figura 3.30:</b> Frequência com que os inquiridos consomem alface. ....	74
<b>Figura 3.31:</b> Local de aquisição da alface. ....	75
<b>Figura 3.32:</b> Forma de aquisição da alface.....	75
<b>Figura 3.33:</b> Frequência com que os inquiridos consomem framboesas.....	76
<b>Figura 3.34:</b> Local de aquisição das framboesas.....	77
<b>Figura 3.35:</b> Forma de aquisição das framboesas. ....	77

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1:</b> Surto relacionados com hortofrutícolas e bactérias patogénicas ocorridos na União Europeia, entre 2004-2010.....	23
<b>Tabela 1.2:</b> Exemplos de métodos publicados para extração de hepatite A em frutas e vegetais.....	26
<b>Tabela 2.1:</b> Reagentes utilizados na preparação da Master Mix necessária para as reações de PCR.....	37
<b>Tabela 2.2:</b> Identidade e especificidades dos <i>primers</i> dos diferentes microrganismos.....	37
<b>Tabela 2.3:</b> Melhores condições de PCR (temperatura de <i>annealing</i> e número de ciclos) determinadas.....	38
<b>Tabela 2.4:</b> Quantidade ( $\mu$ l) dos diferentes componentes a misturar para as diferentes reações a testar, por meio de detecção molecular, para detecção de <i>Salmonella</i> sp.....	40
<b>Tabela 2.5:</b> Exemplo do teste à especificidade dos <i>primers</i> usados para a detecção de <i>Salmonella</i> sp.....	40
<b>Tabela 2.6:</b> Exemplo para a detecção de <i>Salmonella</i> sp., do teste à sensibilidade dos <i>primers</i> para diferentes concentrações de ADN dos diferentes microrganismos.....	41
<b>Tabela 2.7:</b> Identificação das amostras de framboesas e alface analisadas à venda no mercado português.....	44
<b>Tabela 3.1:</b> Valores de absorvância (260nm) e concentração ( $\mu$ g/ml) de ADN dos diferentes microrganismos utilizados.....	50
<b>Tabela 3.2:</b> Valores de concentração ( $\mu$ g/ml) de ADN dos diferentes microrganismos nas diferentes concentrações: C, C/5, C/10, C/15, C/20, C/25.....	58
<b>Tabela 3.3:</b> Valores de concentração final ( $\mu$ g/ml) de ADN de framboesas e alface extraído com um kit comercial.....	60
<b>Tabela 3.4:</b> Resultados do número de células por ml (UFC) e número de células “adicionadas” em cada um dos volumes (50, 100, 150 e 200 $\mu$ l) para cada uma das bactérias.....	61
<b>Tabela 3.5:</b> Resumo dos resultados obtidos (positivos ou negativos) para a eficiência dos métodos de preparação da amostra usados.....	67



## Lista de Abreviaturas e Símbolos

- AIT - Austrian Institute of Technology
- ALT – Alanina aminotransferase
- amb – Ambiente
- AND – Ácido desoxirribonucleico
- ARN – Ácido ribonucleico
- ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
- $a_w$  – Atividade da água
- BPA – Boas Práticas Agrícolas
- BPF – Boas Práticas de Fabrico
- BPH – Boas Práticas de Higiene
- °C – Graus Celcius
- cADN – Ácido desoxirribonucleico complementar
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention
- CE – Comissão Europeia
- Cefas – The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture
- CTAB – Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
- DO – Densidade Ótica
- ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control
- E. coli* – *Escherichia coli*
- EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid
- EFSA – European Food Safety Authority
- ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- EPIS - FWD – Epidemic Intelligence Information System
- EU – European Union
- FAO – Food and Agriculture Organization
- FDA – Food and Drugs Administration
- FIPA – Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares
- fwd – Forward
- g - gramas
- h – Horas
- HACCP – Hazard analysis and critical control points
- HAV – Vírus da hepatite A

HCl – Ácido clorídrico  
H<sub>2</sub>O – Água  
IgG – Imunoglobulina G  
IgM – Imunoglobulina M  
INE – Instituto Nacional de Estatística  
ISO – International Organization for Standardization  
LB – Luria-Bertani  
LiCl – Cloreto de lítio  
*L. monocytogenes* – *Listeria monocytogenes*  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
min – Minutos  
ml – Mililitros  
mM – Milimolar  
m/v – massa/volume  
NA – Nutrient Agar  
NaCl – Cloreto de sódio  
NaOAc – Acetato de sódio  
nm – Nanómetros  
OMS – World Health Organization  
pb – Pares de bases  
PBS – Phosphate-buffer saline  
PCA – Plate Count Agar  
PCR - Polymerase Chain Reaction  
PEG – Polyethylene glycol  
pH – Potencial de Hidrogénio  
PMA – Propídio monoazide  
PVP – Polyvinyl pyrrolidinone  
RASFF – Food and Feed Safety Alerts  
rev – Reverse  
RIA – Radioimunoensaio  
rpm – Rotações por minuto  
RT-PCR - Reverse transcription polymerase chain reaction  
*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

SDS – Sódio dodecil sulfato

TAE – Tris-acetato EDTA

*Taq* – *Thermus aquaticus*

Temp – Temperatura

Tris – Tris-hydroxymethyl-aminomethane

U – Unidades

UFC – Unidades formadoras de colónias

USDA – United States Department of Agriculture

V – Volts

WHO – World Health Organization

μl – Microlitros

μM – Micromolar



## 1. Introdução

Hoje em dia, cada vez mais os consumidores optam por fazer refeições fora de casa devido à ampla variedade que lhes é oferecida, bem como à facilidade de acesso a refeições económicas e rápidas. No entanto, este tipo de refeições são ricas em calorias e pobres nutricionalmente. Por outro lado, a influência de uma dieta equilibrada na saúde de um indivíduo é inquestionável e é hoje universalmente aceite que frutas e vegetais são componentes essenciais para uma dieta diversificada e nutritiva (Santos *et al.*, 2012).

Este tipo de produtos contém na sua constituição elevados níveis de micronutrientes, vitaminas e fibras, sendo o seu consumo recomendado por várias organizações (WHO, FAO, USDA, EFSA) de forma a reduzir o risco de doenças cardiovasculares e cancro (Martín-Belloso e Soliva-Fortuny, 2011; Ramos *et al.*, 2013).

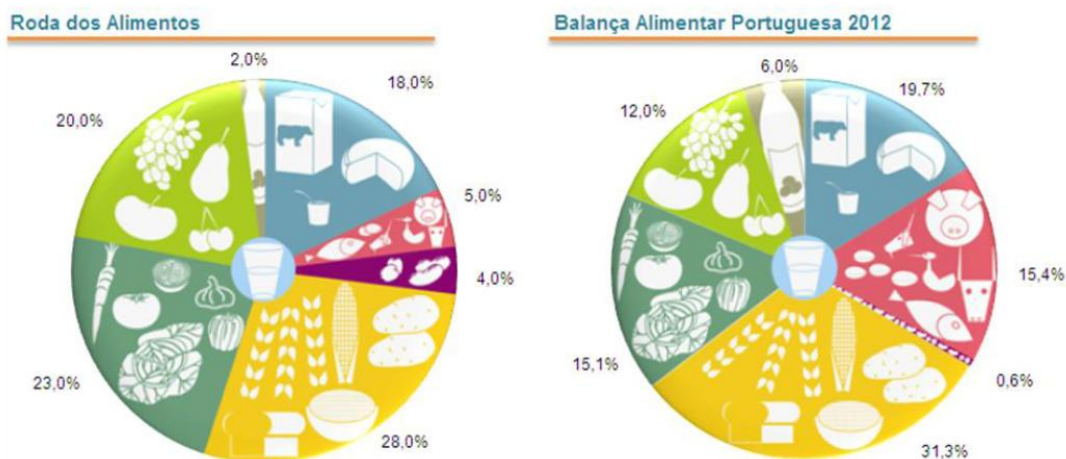
A OMS/FAO, e muitas outras autoridades de saúde de vários países, recomendam o consumo de pelo menos 400g/dia/pessoa de frutas e legumes, o que equivale aproximadamente a 5 porções/dia/pessoa (FAO/OMS, 2003; WHO, sd).

Segundo um relatório da OMS sobre a iniciativa ao consumo de frutas e vegetais, até 2,7 milhões de vidas poderiam ser salvas anualmente se existisse um consumo suficiente de fruta e vegetais. A baixa ingestão deste tipo de alimentos está entre os 10 maiores fatores de risco relacionados com a mortalidade global, estando o seu consumo relacionado com a prevenção de certos tipos de cancro como é o caso do cancro do pulmão, bexiga, boca, faringe, esófago etc. e com a regulação do peso (WHO, 2003).

Segundo a Balança Alimentar Portuguesa<sup>1</sup> (2008-2012) divulgada pelo Instituto Nacional de Estatística (INE), ainda existe um défice na disponibilidade alimentar de “Hortícolas”, “Frutos” e “Leguminosas secas”, face ao excesso de disponibilidade alimentar de “Carne, pescado e ovos” e “Óleos e gorduras” como representado na Figura 1.1 (INE, 2014).

---

<sup>1</sup>A Balança Alimentar Portuguesa (BAP), enquanto instrumento analítico de natureza estatística, permite retratar as disponibilidades alimentares e sua evolução em Portugal, em termos de produtos, nutrientes e calorias, e não a caracterização dos consumos alimentares dos residentes no país. No entanto, dado que os coeficientes de correlação entre a BAP (disponibilidades alimentares) e o Inquérito às Despesas das Famílias - IDEF (quantidades adquiridas pelas famílias residentes), apresentaram correlações positivas, elevadas e estatisticamente significativas, as disponibilidades alimentares constituem uma forma indireta de caracterização do consumo alimentar.



**Figura 1.1:** Comparação entre as recomendações diárias de consumo de cada grupo da roda dos alimentos e o que acontece na realidade. Dados de 2012 (INE, 2014).

Nos últimos anos, muitos países têm empreendido diversas iniciativas de forma a incentivar os consumidores a comer uma maior quantidade deste tipo de produtos. Isto, juntamente com a uma mudança nas tendências de consumo, tais como a falta de tempo para comprar e cozinhar alimentos, a consciência pública dos benefícios para a saúde associados ao consumo deste tipo de produtos, a disponibilidade de produtos de origem vegetal todo o ano, e um aumento na variedade, têm aumentado o comércio internacional destes produtos.

Atualmente, o consumidor apresenta uma maior preocupação com a Segurança dos alimentos que consome, sendo esta, aliada à Qualidade, nos dias de hoje a maior preocupação da Indústria Alimentar. Ou seja, ao mesmo tempo que a Indústria procura satisfazer as preferências do consumidor, esta tenta também garantir a inocuidade dos produtos (FIPA, 2002).

As doenças infecciosas de origem alimentar constituem uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo.

A OMS estima que morram anualmente mais de 2 milhões de pessoas por doenças diarreicas, muitas das quais resultantes do consumo de alimentos contaminados (FAO *et al.*, 2005; Calhau, 2014).

A natureza global da cadeia alimentar e a maior mobilidade das populações conduz a que o risco da produção e distribuição de alimentos não seguros possa transformar um problema de saúde pública local num incidente internacional, com consequências particularmente graves em grupos populacionais de risco (Calhau, 2014). O Surto de *E. coli* O104:H4, que ocorreu na Alemanha em 2011 relacionado com rebentos de soja é um

exemplo desta globalidade que abalou a economia, as importações e a confiança do consumidor, ocorrendo casos em vários países, dentro e fora da União Europeia (EFSA, 2011a).

Relativamente aos hortofrutícolas, problemas ao nível de segurança alimentar têm vindo a destacar-se, o que leva á necessidade de um maior controlo e rigor no que respeita às medidas de prevenção da contaminação destes produtos em todas as suas fases de produção, desde a produção primária à distribuição (“do prado ao prato”) (WHO/FAO, 1998; WHO/FAO, 2008; Martín-Belloso e Soliva-Fortuny, 2011; Veiga *et al.*, 2012; Alegre *et al.*, 2013).

Atualmente vários estudos já foram realizados de forma a constatar quais os perigos mais comuns neste tipo de produtos e quais os métodos mais eficientes de deteção. De forma a atuar na prevenção da contaminação, vários manuais de auxílio aos produtores já se encontram também publicados e disponíveis a toda a comunidade.

### **1.1.Comercialização e consumo de hortofrutícolas em Portugal**

Com a mudança nos hábitos de vida e com o aumento da perceção e preocupação da sociedade atual com a saúde, a procura de produtos hortofrutícolas de fácil utilização e disponibilidade tem vindo a aumentar.

Hoje em dia existe uma enorme variedade de produtos hortofrutícolas disponíveis todo o ano, sejam inteiros frescos, minimamente processados, tratados com calor (por exemplo os enlatados), congelados, em forma de sumos, secos, salgados, fermentados ou acidificados (EFSA, 2013).

Na área dos produtos frescos, a procura pela comodidade e rapidez, tem proporcionado o crescimento da comercialização dos produtos de IV gama. Frutas e vegetais de IV gama (também designados por hortofrutícolas minimamente processados) são todas as frutas e vegetais que tenham sido fisicamente modificados a partir da sua forma original e que incluem operações unitárias simples como a seleção, descasque, limpeza, corte, higienização e embalamento, de forma a obter 100% de produto comestível que será posteriormente armazenado sob refrigeração. O produto minimamente processado inclui qualquer tipo de produto fresco e as suas misturas em diferentes cortes e embalagens, mantendo, tanto quanto possível, as características frescas, a qualidade nutricional e

sensorial dos produtos frescos que lhe deram origem (Campotec, sd; Martins, 2007; Alves e Sousa, 2008).

A finalidade dos produtos de IV gama é oferecer ao consumidor final frutas ou hortícolas prontas a consumir que garantam a segurança alimentar. Outras gamas existentes são (Alves e Sousa, 2008):

I gama – Produtos que não foram submetidos a qualquer tipo de transformação. Estes podem ou não ser embalados, mas no caso de o serem, a embalagem tem apenas a função de proteção mecânica ou estética e nunca a função de conservação.

II gama – Produtos hortofrutícolas comercializados em conserva. Estáveis à temperatura ambiente e a embalagem exerce a função primária de conservação.

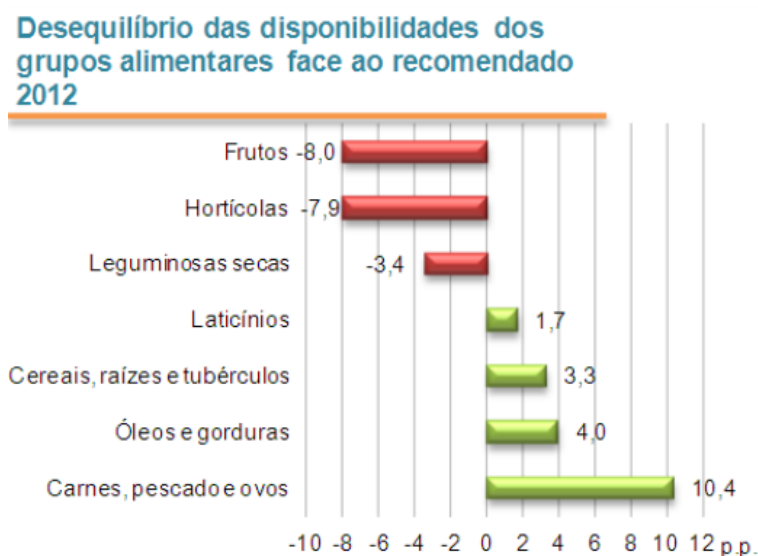
III gama – Produtos conservados por ultracongelação.

V gama – Produtos pré-cozinhados, prontos a consumir, como tal, ou após um simples aquecimento

A fronteira entre as diferentes "gamas" nem sempre é fácil de delimitar, principalmente entre os produtos frescos e os minimamente processados. No mercado português encontram-se alguns casos de produtos hortofrutícolas que foram submetidos a processos mínimos de transformação e que não devem ser englobados na designação de IV gama porque não se encontrarem aptos para o consumo imediato (prontos a consumir), como é o caso de produtos embalados e escolhidos, mas que não foram lavados (Martín-Belloso e Soliva-Fortuny, 2011; Ramos *et al.*, 2013).

O consumo de hortofrutícolas em Portugal, apesar de estar a crescer, ainda apresenta um défice relativamente ao recomendado (400g/dia/hab). A Balança Alimentar Portuguesa de 2008-2012 divulga a Figura 1.2 que representa o desequilíbrio das disponibilidades (equivalente ao consumo) dos grupos alimentares face ao recomendado pelas organizações de saúde no ano 2012 em Portugal (INE, 2014).

Relativamente a “Frutos” e a “Hortícolas” verifica-se uma disponibilidade deficitária para ambos os grupos. Ou seja, em 2012 não houve um adequado consumo deste tipo de produtos face ao recomendado, ao contrário do grupo “Carne, Pescado e Ovos” que apresentou uma disponibilidade bastante acima do consumo recomendado (INE, 2014).



**Figura 1.2:** Desequilíbrio das disponibilidades dos grupos alimentares face ao recomendado em 2012 (INE, 2014).

Também segundo a Roda dos Alimentos, 20,0% da nossa dieta diária deve ser constituída por “Frutos” e 23,0% por “Hortícolas”, o que não acontece na realidade, sendo consumido apenas 12,0% e 15,1%, respetivamente (INE, 2014).

## 1.2. Qualidade e Segurança Alimentar de produtos hortofrutícolas

Muitas vezes se tem falado de Segurança Alimentar e Qualidade, apresentando-os como conceitos similares ou mesmo equivalentes.

Qualidade é, no entanto, muito mais do que a inocuidade dos alimentos, a que vulgarmente se chama Segurança Alimentar, não podendo, por outro lado existir sem ela. Sendo a Qualidade o conjunto de atributos de um alimento que o tornam preferido na sua escolha, por parte do consumidor, integra naturalmente a exigência da sua inocuidade, condição à partida de rejeição, caso não se confirme.

No entanto esta inocuidade, por si só não garante a opção do consumidor. De facto um alimento seguro ou inócuo, se não tiver bom sabor e não responder às qualidades nutricionais, de embalamento, conservação, ou outras que dele espera o consumidor, dificilmente terá a preferência deste último (FIPA, 2002).

Há pois que promover a Qualidade, de forma a que a oferta do mercado corresponda ao que mais preferem os consumidores sem, no entanto, confundir estes dois conceitos (FIPA, 2002).

### 1.2.1. Qualidade Alimentar

A norma ISO 9000:2005 define Qualidade como “Grau de satisfação de requisitos dado por um conjunto de características intrínsecas” e Requisito como “Necessidade ou expectativa expressa, geralmente implícita ou obrigatória”. Ou seja, a Qualidade é o “conjunto dos atributos e características de um produto que estão relacionadas com a sua capacidade para satisfazer necessidades explícitas ou implícitas” (Almeida, 2005; ISO 9000:2005).

Para os consumidores, a qualidade é um conceito subjetivo, sendo o mais importante, o aspeto, a frescura e a textura que o produto apresenta no momento da compra e posteriormente as características organoléticas (sabor e aroma), nutricionais e higio-sanitárias (Veiga *et al.*, 2012).

Para o consumidor, o termo “Qualidade”, é dividido em duas vertentes: as características intrínsecas que estão diretamente relacionadas com o produto (aspeto, frescura, tamanho, defeitos, forma, homogeneidade, cor, brilho, sabor, aroma, valor nutritivo, vitaminas, minerais, fibra, estado microbiológico, resíduos de pesticidas, produtos de limpeza e desinfeção) e as características exógenas, as quais nada tem a ver com o produto propriamente dito, mas sim com: a apresentação, a identificação, a facilidade para consumir de imediato, a correspondência com uma determinada marca e a relação preço/qualidade.

De um modo geral estas características estão regulamentadas por normas de comercialização como por exemplo: produtos isentos de defeitos, de humidades, de odores, de sabores estranhos, limpos, sãos e divididos pelo seu calibre (Veiga *et al.*, 2012).

Com a mudança nas tendências de consumo, os requisitos do consumidor começam a basear-se num alimento seguro, nutritivo, saudável, mais natural, fresco, com alta qualidade e mais conveniente. De forma a atender às expectativas do consumidor, a indústria começa a arranjar alternativas para diminuir o processamento, reduzir aditivos sintéticos, diminuir a quantidade de açúcares, gorduras, sal e reduzir/eliminar microrganismos deterioradores e patogénicos. Daí o aparecimento do conceito de produto minimamente processado.

As frutas e hortícolas frescos e de IV gama, tratando-se de tecidos vivos, destacam-se pela sua perecibilidade e pela importância que a aparência de frescura tem na sua qualidade, e conseqüentemente na aptidão comercial. Os produtos hortofrutícolas em

natureza caracterizam-se por apresentarem qualidade máxima à colheita. Ao longo da cadeia de distribuição a qualidade tende a diminuir, sendo que a perda de qualidade implica elevados prejuízos para os diferentes intervenientes da cadeia (Almeida, 2005).

São diversos os fatores condicionantes da manutenção da qualidade na pós-colheita dos produtos hortofrutícolas. Muitos destes fatores são inerentes ao produto enquanto outros são consequência da operação de colheita. Depois de colhido, o produto fica privado de água e nutrientes responsáveis por contrariar a senescência (envelhecimento). Assim sendo, o ambiente de armazenamento terá um papel determinante na velocidade com que ocorre a deterioração do produto.

De modo a reduzir as perdas de qualidade até ao consumo, os produtores e distribuidores devem em primeiro lugar, conhecer e entender os fatores biológicos e ambientais envolvidos na deterioração deste tipo de produtos e usar técnicas pós-colheita que atrasem a senescência e mantenham a melhor qualidade possível, como a utilização de uma correta conservação (Pinto e Morais, 2002).

### **1.2.2. Segurança Alimentar**

A norma ISO 22000:2005 define Segurança alimentar como “Conceito de que um género alimentício não causará dano ao consumidor quando preparado e/ou ingerido de acordo com a utilização prevista” (ISO 22000:2005).

Os perigos alimentares decorrentes do consumo de hortofrutícolas estão relacionados com possíveis contaminações de origem química, física e biológica.

Os perigos químicos podem ser inerentes ou não aos produtos hortofrutícolas, uma vez que existem substâncias químicas naturais que podem colocar em risco a saúde de alguns consumidores (exemplos: glicoalcalóides (solanina) em batata; toxinas de origem fúngica (micotoxinas) em frutos secos, entre outros) e outras substâncias químicas que podem contaminar os alimentos por más práticas agrícolas, de produção ou higiene (resíduos de produtos fitofarmacêuticos, resíduos de detergentes e desinfetantes, contaminação por lubrificantes dos equipamentos, entre outros) (Veiga *et al.*, 2012).

Os perigos físicos, embora em menor escala, também podem ocorrer, sendo resultado de objetos estranhos como pedras, peças metálicas, vidros, terra, entre outros (Veiga *et al.*, 2012).

Neste trabalho de investigação, serão abordados os perigos provenientes de contaminação biológica. No entanto as restantes origens de possíveis contaminações não devem ser esquecidas.

Ao contrário de outros tipos de processamento, como a congelação ou conserva, os produtos frescos e minimamente processados, não sofrem qualquer tratamento térmico capaz de eliminar ou reduzir para níveis aceitáveis a carga microbiana patogénica (Lamikanra, 2002).

Desta forma, é importante que exista um controlo rigoroso em todas as etapas de fabrico destes produtos, desde a produção primária até à distribuição.

A produção da maioria dos hortofrutícolas envolve atividades de pré-colheita e pós-colheita, como a preparação do campo, plantação, crescimento, irrigação, fertilização, colheita, processamento, armazenamento e transporte. No entanto, as práticas de produção variam dependendo do produto, e por isso os produtores necessitam de avaliar as práticas agrícolas para cada área de produção primária específica, de forma a garantir a produção de frutas e legumes seguros.

Além disso, os riscos microbianos e as fontes de contaminação também podem variar significativamente consoante o tipo de culturas, os sistemas de produção e as práticas agrícolas (EFSA, 2013).

Hoje em dia os consumidores já começam a ter consciência dos problemas relativos à segurança alimentar e começam a procurar produtos mais seguros.

No caso das frutas e vegetais, começam agora a ser estudados novos métodos que visam a eliminação microbiana e que englobam processos não térmicos, com tratamentos baseados em ozono, radiação ultravioleta, luz pulsada etc. (Goodbum e Wallace, 2013; Ramos, 2013).

A WHO/FAO lançou em 2008 um Relatório sobre Perigos Microbiológicos em Frutas e Vegetais Frescos (*Meeting Report – Microbiological Hazards in Fresh and Vegetables*), onde categoriza os produtos frescos em 3 níveis de prioridades em termos de segurança alimentar. Como prioridade de Nível 1, e portanto com maior preocupação em termos de segurança alimentar, encontram-se os vegetais de folhas verdes. No Nível 2 as bagas, melão, tomate, cebolinho e sementes, e por fim no Nível 3, todos os outros produtos frescos. Esta categorização tem em conta: frequência e gravidade da doença; tamanho e escopo de produção; diversidade e complexidade da cadeia de produção e da indústria; potencial para multiplicação do patogénico de origem alimentar; potencial para o controlo

do patogénico; extensão do comércio internacional e impacto económico (WHO/FAO, 2008; Veiga *et al.*, 2012; Goodbum e Wallace, 2013).

Desta forma, e após várias pesquisas na literatura e na plataforma RASFF<sup>2</sup> acerca da frequência do aparecimento de surtos/casos pontuais e de ocorrências de contaminações com microrganismos patogénicos em produtos hortofrutícolas, foram escolhidos dois tipos de produtos para análise da sua inocuidade ao nível de determinados microrganismos patogénicos: framboesas (referente ao Nível 2) e alface (referente ao Nível 1).

### **1.2.2.1.Principais Microrganismos**

Frutas e vegetais têm diferentes morfologias e funções metabólicas e, conseqüentemente proporcionam diversos nichos ecológicos para os microrganismos. A presença e o número de microrganismos variam consoante o tipo de produto, práticas agrícolas, área geográfica de produção e condições meteorológicas antes da colheita (Ramos *et al.*, 2013).

No caso particular das frutas e vegetais, a microflora natural é geralmente não patogénica e pode estar presente no momento de consumo. No entanto durante o crescimento, colheita, transporte, processamento e manuseio, ou até mesmo em casa do consumidor, os produtos podem ser contaminados com agentes patogénicos de fonte ambiental, humana ou animal, comprometendo assim a saúde pública (European Commission, 2002; Lamikanra, 2002).

Bactérias de deterioração (como por exemplo *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Enterobacter*), leveduras (como por exemplo *Saccharomyces* e *Candida*) e bolores (como por exemplo *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus*) dominam a microflora em frutas e vegetais crus. No entanto, a presença ocasional de bactérias patogénicas, parasitas e vírus capazes de causar infeção em humanos têm vindo a aparecer. (Lamikanra, 2002; Martín-Belloso e Soliva-Fortuny, 2011; Alegre *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2013).

Ao longo dos anos a incidência de surtos relacionados com este tipo de produtos tem aumentado. São vários os patogénicos mais frequentes e de interesse: *Salmonella* sp.; *Shigella* spp.; *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; Vírus (Hepatite A e Norovírus); Parasitas (por exemplo *Cryptosporidium* spp. e *Cyclospora* spp.). Existem também alguns

---

<sup>2</sup> O Sistema de Alerta Rápido – RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) – é uma ferramenta que possibilita a troca permanente de informação atualizada sobre ocorrências de perigos sanitários nos géneros alimentícios e nos alimentos para animais, bem como sobre os resultados das medidas adotadas para controlar as situações detetadas e das respetivas ações de seguimento desencadeadas (Almeida e Bernardo, 2007).

patogénicos menos frequentes mas com possível interesse: *Campylobacter*; *Staphylococcus aureus*; *Clostridium* spp; *Bacillus cereus*; *Yersinia enterocolitica*; *Vibrio* spp. (WHO/FAO, 1998; Lamikanra, 2002; Martín-Belloso e Soliva-Fortuny, 2011; Olaimat, Holley, 2012; Ramos *et al.*, 2013).

Apesar do aumento de surtos, a proporção de surtos alimentares atribuída a frutas e legumes é relativamente baixa em comparação com produtos de origem animal e outros produtos prontos a consumir, no entanto quando ocorrem a gravidade pode ser bastante severa, como ilustrado pelo surto de *Escherichia coli* de serotipo O104:H4 na Alemanha em 2011, relacionado com rebentos de soja e que provocou vários mortos (WHO/FAO, 1998; EFSA, 2011a; Martín-Belloso e Soliva-Fortuny, 2011; Goodbum e Wallace, 2013; EFSA, 2013; Ramos *et al.*, 2013).

De entre os microrganismos patogénicos mais comuns e de maior interesse para os produtos selecionados, foram escolhidos cinco: *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e vírus da hepatite A.

### Salmonella

*Salmonella* é uma bactéria Gram-negativa, que está amplamente distribuída na natureza. Faz parte da flora intestinal normal de alguns animais, como insetos, pássaros e animais domésticos e nestes causa salmonelose, podendo depois manter-se no animal, tornando-o apenas portador da bactéria. No caso dos humanos, estes podem tornar-se portadores da bactéria após uma infeção provocada pela mesma.

É transmitida através da via fecal-oral, após o contacto com água contaminada ou alimentos contaminados.

Dependendo da espécie envolvida, as infeções por *Salmonella* podem causar diferentes sintomas. Os sintomas característicos incluem: diarreia, náuseas, dor abdominal, febre branda e calafrios, algumas vezes vômitos, dor de cabeça e fraqueza, desaparecendo normalmente entre 4 a 7 dias. Bactérias como *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi* A, B e C produzem febre tifoide, colocando o indivíduo em risco de vida (WHO/FAO, 1998; Forsythe, 2002; ASAE, 2014).

### Escherichia coli

A *Escherichia coli* é comum na microflora normal do trato intestinal de seres humanos e outros animais de sangue quente. A maioria dos serogrupos de *E. coli* faz parte da flora

comensal do intestino dos mamíferos. No entanto, certos serotipos são patogênicos para o Homem e para outros animais, e estes não são considerados como fazendo parte da flora intestinal normal. As estirpes que causam doença diarreica são classificadas em grupos com base em propriedades de virulência, mecanismos de patogenicidade, sintomas clínicos e características antigênicas.

Dentro dos diferentes grupos de *E. coli*, destaca-se a *E. coli enterohemorrágica* (EHEC) que coloniza o trato intestinal e produz verotoxinas, que podem provocar uma colite hemorrágica, sendo este o grupo de maior preocupação e onde se inclui a *E. coli* O157:H7. As bactérias do género *E. coli* são bactérias Gram-negativas e a transmissão das infeções seguem principalmente três vias: o contacto direto com animais, o contacto com humanos e o consumo de alimentos contaminados.

Os sintomas dependem da estirpe envolvida (WHO/FAO, 1998; Lamikanra, 2002).

### *Staphylococcus aureus*

As intoxicações causadas por *Staphylococcus aureus* resultam da ingestão de uma toxina pré-formada em alimentos contaminados com este microrganismo. Apesar destas intoxicações não serem particularmente severas, são muito frequentes, podendo ocorrer isoladamente ou em surtos.

*S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, e os humanos são a principal fonte de estirpes produtoras de enterotoxinas, estando estas presentes nas vias nasais, na garganta, no cabelo e na pele. Por essa razão, alimentos que requerem manipulação durante a preparação, ou após processamento, estão frequentemente envolvidos nestas intoxicações.

Tendo em conta que a produção da toxina ocorre a temperaturas entre os 10 e 45°C, muitas das intoxicações causadas por esta bactéria ocorrem porque o alimento não foi mantido quente (60°C ou mais), ou frio o suficiente (menos de 7°C).

Este organismo não possui uma grande capacidade de competição com outras bactérias e, por isso, raramente causa doenças alimentares após ingestão de alimentos crus (frutas e vegetais), pois estes possuem uma microflora natural não patogénica e portanto esta bactéria é, normalmente, incapaz de se desenvolver de modo a produzir a toxina.

Os sintomas de intoxicação por *S. aureus* surgem, dependendo da quantidade de toxina ingerida, entre 1 e 7 horas após o consumo do alimento contaminado sendo os mais comuns: náuseas, vômitos e dores abdominais, e podem durar até 48 horas (Forsythe, 2002; Abraham *et al.*, 2012; ASAE, 2014).

### Listeria monocytogenes

É uma bactéria Gram-positiva de distribuição ubiqüitária. Pode ser encontrada no solo, vegetais, carne e peixe. Adicionalmente, os animais e o Homem podem ser portadores assintomáticos da bactéria. Assim, a contaminação de matérias-primas e de alimentos não processados é frequente.

A listeriose é essencialmente transmitida através do consumo de alimentos contaminados, ou pela contaminação do recém-nascido durante o parto, por infeção cruzada e pelo contacto com animais.

Pode ser fatal para alguns indivíduos, como imunodeficientes, grávidas, recém-nascidos e crianças.

Possui uma grande versatilidade de crescimento em alimentos que se encontram a temperaturas refrigeradas, como por exemplo em alimentos que são cozinhados e depois mantidos durante longos períodos em frigoríficos.

Nos adultos e nos recém-nascidos, as manifestações clínicas de listeriose descritas com maior frequência são septicémia e/ou infeções meníngeas. Nas grávidas, a infeção ocorre geralmente no terceiro trimestre de gestação e os sintomas confundem-se com os de uma gripe (Lamikanra, 2002; ASAE, 2014).

### Vírus da Hepatite

Existem pelo menos sete vírus da hepatite, designados de A a G. A hepatite viral é uma doença sistémica em que o órgão alvo é, primordialmente, o fígado. Embora o fígado seja o órgão-alvo de todos eles, eles diferem bastante na sua estrutura, modo de replicação, forma de transmissão e evolução da doença por eles causada. Todos eles são facilmente transmissíveis, uma vez que os indivíduos infetados são contagiosos antes de apresentarem sintomas ou até mesmo na ausência destes. Cada um dos vírus da hepatite infeta e lesa o fígado causando os clássicos sintomas ictericos e a libertação de enzimas hepáticas. No entanto grande parte das infeções hepáticas cursa assintomaticamente ou apresenta um quadro clinico ligeiro, a qual pode passar despercebida ao próprio doente (Murray *et al.*, 2000; Canas e Sousa, 2002; Forsythe, 2002).

Estrutura/constituição do vírus da hepatite A:

O vírus da hepatite A (HAV) é causado por um picornavírus (pico “pequeno”; rna “ácido ribonucleico”), um vírus de ARN, do género hepatovírus. Foi descoberto pela primeira vez em 1973 e existe apenas um serotipo (é o único hepatovírus).

Estruturalmente este vírus é constituído por uma única molécula de ARN rodeado por um capsídeo icosaédrico sem envelope.

Um aspeto muito importante que distingue o HAV de outros picornavírus é a sua excecional estabilidade que permite a sua manutenção e propagação na população (Murray *et al.*, 2000; Canas e Sousa, 2002).

Patogenia/Manifestações clínicas:

A hepatite A é uma infeção do fígado que, normalmente é uma doença leve caracterizada por sintomas semelhantes à gripe, como perda de apetite, fadiga, desconforto abdominal e febre. Mais tarde poderá ocorrer a icterícia, o que indica dano no fígado. A icterícia leva o paciente a apresentar a pele e mucosas amareladas e dura entre 2 a 3 semanas.

Felizmente, este tipo de hepatite raramente é fatal (taxa global de mortalidade varia entre 0,1% e 1%, sendo maior à medida que a idade aumenta e maior em doentes hepáticos), e a recuperação ocorre gradualmente num período de duas a seis semanas.

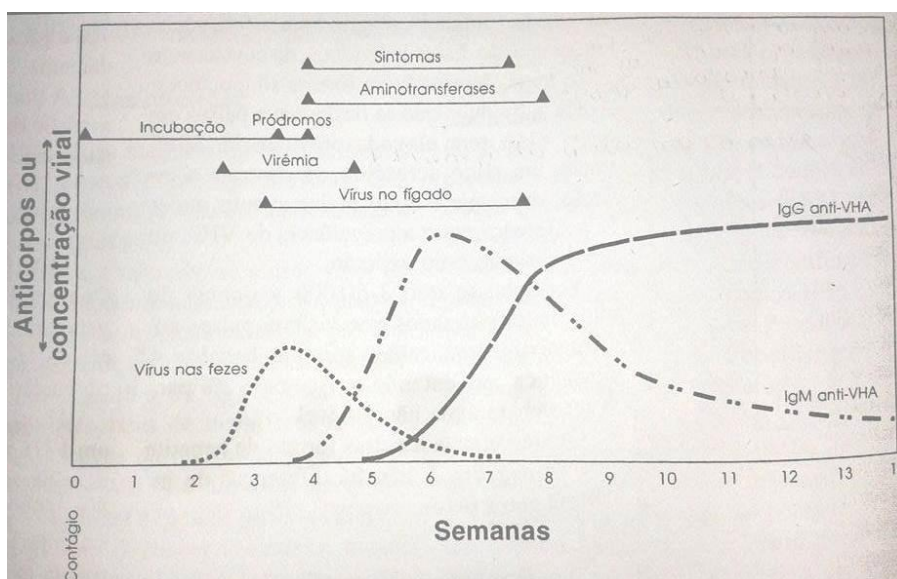
A doença é geralmente mais grave quanto mais velha a pessoa é, e crianças infetadas menores de 6 anos não experimentam, normalmente, sintomas perceptíveis.

As manifestações clínicas da infeção pelo HAV sintomático podem variar de uma doença aguda (com ou sem icterícia) para hepatite fulminante, tendo esta última uma elevada taxa de mortalidade mas uma incidência bastante baixa. Nos casos assintomáticos a infeção apenas pode ser reconhecida pela deteção de alterações bioquímicas ou sorológicas no sangue (Murray *et al.*, 2000; Canas e Sousa, 2002; Pereira e Gonçalves, 2003).

Após a infeção com o vírus, este quando atinge o trato intestinal, infeta as células superficiais da parede intestinal e dissemina-se para as células adjacentes, invadindo a corrente sanguínea e posteriormente o fígado onde se liga a recetores específicos nos hepatócitos (células encontradas no fígado capazes de sintetizar proteínas).

O genoma viral liberta-se do cápsideo, inicia a replicação viral e é excretado na bñlis para as fezes (Canas e Sousa, 2002).

A forma aguda da hepatite A apresenta várias etapas. A Figura 1.3 representa a evolução cronológica de alguns dos marcadores da infeção pelo HAV.



**Figura 1.3:** Evolução de alguns dos marcadores da infecção pelo vírus da hepatite A. Sintomas, aspetos imunológicos e biológicos (Canas e Sousa, 2002).

- 1) O período de incubação (tempo que decorre desde a exposição ao vírus até ao aparecimento dos sintomas) é, em média, de 4 semanas (2 a 7 semanas), sendo diretamente proporcional à quantidade do inóculo.
- 2) A fase prodrómica (conjunto de sinais e sintomas que prenunciam uma doença ou uma alteração da normalidade orgânica) pode durar desde vários dias até mais do que uma semana. O vírus começa a ser eliminado pelas fezes nesta etapa.
- 3) A fase icterícia, que pode ou não ocorrer, começa dentro de 10 dias após os sintomas iniciais e a febre normalmente melhora após os primeiros dias de icterícia. É, normalmente, nesta fase que os pacientes procuram ajuda médica.
- 4) A virémia (presença do vírus no sangue) termina pouco depois da hepatite se desenvolver, embora as fezes permanecem infecciosas por mais 1-2 semanas.
- 5) Período de convalescença em que a recuperação é lenta mas normalmente completa. A reincidência ocorre em 3-20% dos paciências, 4-15 semanas após os sintomas terem desaparecido (Murray *et al.*, 2000; Canas e Sousa, 2002; WHO, 2002).

O pico da infetividade ocorre durante o período de 2 semanas que antecede o início da icterícia e diminui durante a semana após o início da icterícia. Em pessoas sem icterícia, o pico da infetividade provavelmente ocorre com o aumento da concentração de alanina aminotransferase (ALT – enzimas libertadas no sangue quando há dano nas membranas do hepatócito). A virémia pode ser detetada antes do aumento de concentração de ALT, e os

níveis de ARN de HAV muitas vezes permanecem detetáveis, mesmo após o nível ALT ter normalizado e os sintomas tenham desaparecido (Murray *et al.*, 2000; Canas e Sousa, 2002; Fiore, 2004).

#### Diagnóstico:

O diagnóstico da infeção por HAV é geralmente estabelecido com base na evolução cronológica dos sintomas clínicos, na identificação de uma fonte infetada conhecida e, com mais segurança, nos resultados fornecidos por testes sorológicos específicos.

Por rotina, o diagnóstico é feito através da pesquisa de anticorpos específicos da classe IgM (Imunoglobulina M) através de Imunoensaio de fase solida (ELISA) ou Radioimunoensaio (RIA), disponíveis em kits comerciais. Estes anticorpos aparecem no soro cerca de 3-7 semanas após o contágio, e são quase sempre detetáveis quando aparecem os sinais e sintomas da doença. Os anticorpos IgM mantêm-se, normalmente, durante 2-6 meses após a infeção e a sua deteção é sinónimo de infeção pelo vírus HAV.

Durante a fase de convalescença, aparecem também anticorpos da classe IgG (Imunoglobulina G), os quais permanecem detetáveis indefinidamente e conferem imunidade à hepatite A para o resto da vida (Murray *et al.*, 2000; Canas e Sousa, 2002; WHO, 2000; Fiore, 2004).

#### Transmissão:

A transmissão pode ocorrer por via fecal-oral, por contacto direto com uma pessoa infetada ou pela ingestão de alimentos ou água contaminados com HAV. Ocasionalmente também pode ser adquirida por contacto sexual ou transfusões de sangue.

A dose mínima infecciosa necessária para provocar infeção em seres humanos não é conhecida, mas é defendido que uma pequena dose é suficiente para causar infeção via oral.

A contaminação de alimentos com HAV pode ocorrer de várias maneiras diferentes: frutas e vegetais cultivados e/ou irrigados com materiais contaminados com fezes, marisco cultivado e colhido de águas poluídas por resíduos fecais, processamento e preparação de alimentos em equipamentos contaminados, manipuladores de alimentos infetados ou com falta de higiene. Estabelecimentos alimentares com más condições sanitárias e sistemas de eliminação de resíduos inadequados, juntamente com práticas de fabricação insatisfatórias,

podem também contribuir para a contaminação dos alimentos (Hui *et al.*, 2001; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012).

Até à data não foi identificado um ponto específico de cultivo, colheita ou processamento em que a contaminação ocorre, pois esta pode acontecer por várias fontes e em várias etapas. Torna-se assim importante desenvolver uma melhor compreensão de como a contaminação de produtos frescos ocorre e por que certos produtos são mais propensos, tornando-se assim mais fácil o seu controlo e prevenção (Fiore, 2004).

### **1.2.2.2.Mecanismos de contaminação e prevenção**

Segundo a alínea 2, do ponto II, da Parte A, do Anexo I, do Regulamento (CE) nº852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, os operadores das empresas do sector alimentar devem assegurar, tanto quanto possível, que os produtos da produção primária sejam protegidos de contaminações, atendendo a qualquer transformação que esses produtos sofram posteriormente.

De forma geral, a sobrevivência, o crescimento e multiplicação de microrganismos nos alimentos depende de vários fatores, que podem ser intrínsecos, se estiverem associados ao próprio alimento (como  $a_w$ ; pH; composição nutricional, entre outros) ou extrínsecos quando associados ao ambiente que o rodeia (como a temperatura e humidade) e aos processos utilizados desde a sua germinação até chegar ao local de preparação (European Commission, 2002).

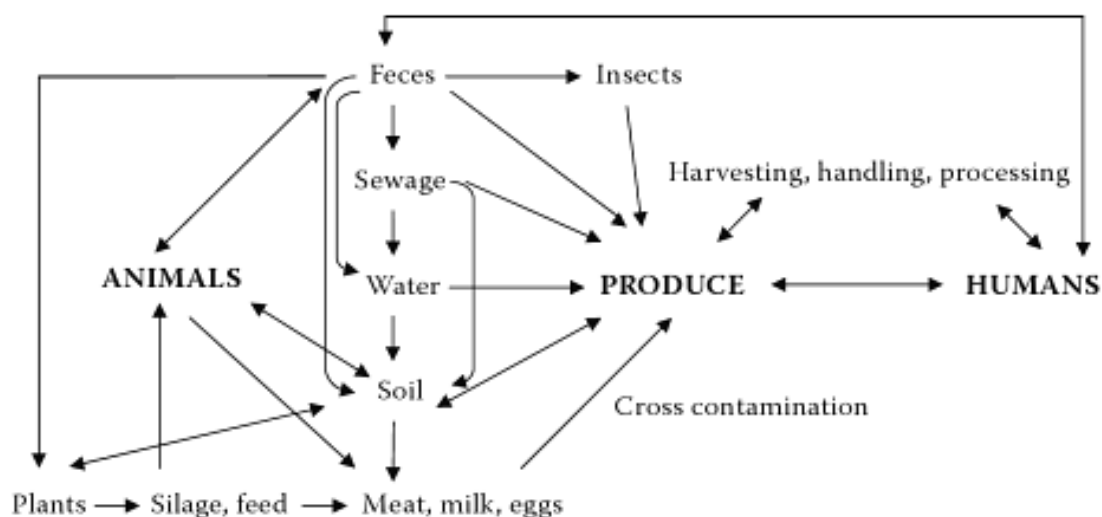
Os limites mínimos para o crescimento de patogénicos devem ser tidos em conta e encontram-se resumidos num parecer do Painel científico da EFSA sobre Riscos Biológicos (Painel BIOHAZ) publicado em 2012 e intitulado “*Scientific Opinion on Public health risks represented by certain composite products containing food of animal origin*” (EFSA, 2012; EFSA, 2013).

A produção de géneros alimentícios implica uma visão integrada desde a produção primária até ao consumidor final, “do prado ao prato”, onde os produtos hortofrutícolas não são exceção (item n.º1 do capítulo I do Regulamento (CE) N.º 852/2004 de 29 de Abril).

Os produtos hortofrutícolas são cultivados e colhidos sob uma variadíssima gama de condições climáticas e geográficas, utilizando-se diferentes tipos de produção e de equipamentos. Assim sendo, os perigos biológicos, químicos e físicos variam com esses fatores.

Condições e medidas tomadas durante a pré-colheita, colheita e pós-colheita afetam a contaminação microbiana de frutas e vegetais, e devem ser tidas em conta de forma a minimizar o risco de contaminações. Assim as fases a considerar, neste tipo de produtos, tendo em conta o conceito “do prado ao prato” incluem: produção primária (cultivo); colheita, armazenamento e transporte; processamento industrial; comercialização; consumidor final (European Commission, 2002; Veiga *et al.*, 2012).

A Figura 1.4 resume os mecanismos potenciais pelos quais os microrganismos patogénicos podem contaminar frutas e vegetais frescos.



**Figura 1.4:** Mecanismos pelos quais frutas e vegetais frescos podem ser contaminados com microrganismos patogénicos (WHO/FAO, 1998; Martín-Belloso e Soliva-Fortuny, 2011).

De um modo geral, na produção primária, alguns aspetos a ter em conta de forma a evitar contaminações são: historial do campo e terras adjacentes (antes das sementeiras ou plantações deve avaliar-se a possível presença de contaminantes resultantes de produções anteriores); fertilizantes (se foram utilizados incorretamente podem ser uma fonte direta ou indireta de microrganismos); água utilizada (é importante ter atenção à origem da água utilizada, pois esta deve estar isenta de contaminações); controlo animal (é necessário ter atenção à presença de pragas, infestantes e animais selvagens, tentando precaver ou minimizar a sua presença) (European Commission, 2002; Veiga *et al.*, 2012; EFSA, 2013).

Enquanto na produção primária a preocupação com a qualidade sanitária está principalmente associada a fatores relacionados com o campo, na colheita e pós-colheita, a introdução do contato humano e mecânico tem tido maior impacto na segurança microbiológica de produtos frescos (Bastos, 2006; EFSA, 2013).

A fase da colheita deve ser realizada quando o produto atinge um estado de maturação adequado, ou seja, um estado que permitirá ao produto chegar ao mercado com as características desejadas pelo consumidor.

Durante as etapas seguintes à produção primária, é importante que sejam prevenidas contaminações cruzadas e o produto seja manuseado, transportado e armazenado em condições de temperatura, humidade, higiene e segurança adequadas (European Commission, 2002; Bastos, 2006; EFSA, 2013).

Quando o consumidor final adquire um género alimentício deve ter a consciência que é o elo final de uma cadeia e, como tal, também ele deve estar desperto para cumprir com determinados procedimentos que lhes garantam o consumo de um produto seguro. Esses procedimentos incluem, para além do descrito no rótulo, armazenar o produto adequadamente, de forma a que este não seja contaminado com outros produtos e/ou utensílios, evitar contaminações cruzadas, ter uma boa conduta de higiene, entre outros (EFSA, 2011b; Veiga *et al.*, 2012).

### Ferramentas de Gestão da Segurança Alimentar

Embora a Segurança seja uma componente da Qualidade, a garantia da segurança e a garantia da qualidade é frequentemente efetuada por programas distintos, embora complementares.

Para essa segurança ser alcançada, algumas ferramentas de gestão são adotadas na cadeia de produção de alimentos. Na produção de hortofrutícolas, têm-se recomendado as Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Fabrico (BPF) e Higiene (BPH) e o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP) (EFSA, 2011b).

De acordo com o ponto 1, do Artigo 1.º, do Capítulo I, do Regulamento (CE) n.º852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, os operadores do sector alimentar são os principais responsáveis pela segurança dos géneros alimentícios, devendo aplicar os procedimentos baseados nos princípios de HACCP, tendo como ponto de partida a implementação dos códigos de boas práticas de higiene.

As BPA são um conjunto de normas e orientações, que visam auxiliar os agricultores, para se atingir o padrão de identidade e qualidade da matéria-prima.

As BPF e BPH são um conjunto de princípios e regras para o correto manuseamento de alimentos, abrangendo desde as matérias-primas até ao produto final, de forma a garantir a segurança e integridade do consumidor. As BPF e BPH foram desenvolvidas por governos, pelo Comité de Higiene de Alimentos do *Codex Alimentarius* (FAO/WHO) e por indústrias de alimentos, muitas vezes em colaboração com grupos de inspeção e controlo (Almeida, 2005; Bastos, 2006; Tiago, 2010).

O sistema HACCP é um sistema que tem como objetivo garantir a segurança dos alimentos através da identificação dos perigos associados ao seu manuseamento e das medidas adequadas ao seu controlo.

Deve assim ser encarado como uma ferramenta de análise e prevenção de perigos ligados ao processamento alimentar e não para o controlo apenas do produto final.

Este sistema de autocontrolo pode ser aplicado ao longo de toda a cadeia alimentar, desde a produção primária até ao consumidor final, e a sua implementação deve ser orientada por evidências científicas dos perigos para a saúde pública (Baptista *et al.*, 2003; Vaz *et al.*, 2010).

Por ser um sistema bastante flexível, no caso dos hortofrutícolas, em que o processamento pode ser bastante simples (como nos minimamente processados ou frescos), este sistema pode ser implementado de forma simplificada. Em certos casos, as boas práticas por si só conseguem garantir a segurança de forma eficaz. Nestes casos, deve-se considerar que a obrigação nos termos do ponto 1, do Artigo 5.º, do Capítulo II, do Regulamento (CE) nº852/2004 que se refere á obrigatoriedade de implementação de um processo ou processos baseados nos princípios HACCP, foi cumprida (Comissão das Comunidades Europeias, 2005).

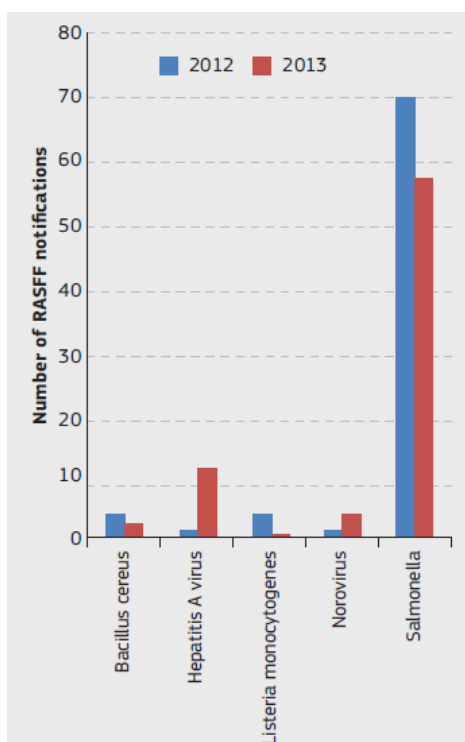
Vários manuais com recomendações gerais, e algumas específicas, estão disponíveis para auxiliar os agricultores na produção de hortofrutícolas seguros para a saúde humana. De entre eles destaca-se “*Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh- Fruits and Vegetables*” publicado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (FDA) em 1998, e o “*Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables*” pertencente ao *Codex Alimentarius* (FDA, 1998; European commission, 2002; Codex Alimentarius Commission, 2003; Olaimat e Holley, 2012).

Para que estas recomendações sejam postas em prática corretamente, é importante que todos os manipuladores recebam formação básica sobre essas mesmas práticas, como mencionado no ponto 1, do Capítulo XII, do Anexo II, do Regulamento (CE) nº852/2004.

### 1.2.3. Epidemiologia

Doenças de origem alimentar causadas por alimentos de origem não animal contaminados com bactérias patogénicas, vírus e parasitas são um importante problema de saúde em todo o mundo.

De acordo com o “*Preliminary Annual Report*” publicado em 2013 pela plataforma RASFF, de um modo geral, em 2013, a categoria de perigo com mais notificações foi a de “Microorganismos Patogénicos” (774 notificações) e a categoria de produtos com mais notificações foi “Frutas e Vegetais” (642 notificações), sendo a *Salmonella* o patogénico mais frequente, como ilustrado pela Figura 1.5. No entanto, Portugal continua a ser dos países da União Europeia com menos notificações (40 notificações em 2013) (RASFF, 2013). Resta no entanto saber se por falta de dados ou se por ausência de contaminações.



**Figura 1.5:** Patogénicos com mais notificações em frutas e vegetais em 2012 e 2013 (RASFF, 2013).

O relatório científico da AIT “*Food of plant origin: production methods and microbiological hazards linked to food-borne disease. Reference: CFT/EFSA/BIOHAZ/2012/01 Lot 1 (Food of plant origin with high water content such as fruits, vegetables, juices and herbs)*” publicado em 2013, apresenta um estudo que foi criado com uma extensa revisão da literatura e tem como objetivo avaliar os riscos biológicos associados a produtos de origem não animal com alto teor de água (frutas e vegetais) em países pertencentes à União Europeia e países não pertencentes à União Europeia. O estudo fornece uma extensa base de dados científicos que serão fundamentais para a conceituação de medidas específicas, bem como para a prevenção e eficiente controlo de surtos de doenças ligadas a alimentos de origem não animal (AIT, 2013).

Também o relatório científico criado pela EFSA e ECDC “*The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012*” publicado em 2014, apresenta informações sobre a ocorrência de zoonoses e surtos de origem alimentar em 27 países da União Europeia (EFSA/ECDC, 2014a).

De acordo com o parecer científico “*Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations)*” publicado pela EFSA em 2013, alimentos de origem não animal estão frequentemente associados a grandes surtos. Também neste parecer foi concluído que a combinação patogénico/alimento mais preocupante foi *Salmonella* sp. e legumes de folhas verdes consumidos crus, seguindo-se a *Salmonella* sp. e bolbos e brotos e *Salmonella* sp. e tomates (EFSA, 2013).

Outro parecer científico publicado em 2014 pela EFSA, “*Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in berries)*”, concluiu que cada ambiente de cultivo representa uma combinação única de fatores de risco que podem influenciar a ocorrência e persistência de patogénicos na produção de frutas. A implementação adequada de sistemas de gestão de segurança alimentar, incluindo boas práticas, devem ser objetivos primários dos produtores, nomeadamente dos produtores de bagas. Surtos relacionados com norovírus em framboesas e morangos congelados são um risco emergente para a saúde pública., no entanto ainda não se sabe se a contaminação ocorre no processamento mínimo, ou durante a produção primária (EFSA, 2014).

Surto de hepatite A em vários países da União Europeia – Última atualização: 11 de Abril de 2014 (EFSA/ECDC, 2014b):

Desde Janeiro de 2013, 1315 casos de infeção por hepatite A foram relatados por 11 Estados-Membros como potencialmente vinculados ao mesmo surto infeccioso pelo HAV. Destes, 240 casos compartilhavam a mesma sequência (KF182323) na junção VP1-2a do genoma viral.

Numa primeira fase, o surto foi associado com viajantes que retornavam de Itália. No entanto, para além de Itália, outros sete Estados-Membros já notificaram casos sem histórico de viagens: França, Alemanha, Irlanda, Noruega, Países Baixos, Suécia e Reino Unido.

Investigações epidemiológicas, microbiológicas e ambientais indicaram bagas mistas congeladas como o veículo de infeção deste surto. No entanto, outras hipóteses não são excluídas, como a contaminação cruzada em ambiente de produção de alimentos.

A ECDC recomenda aumentar a consciencialização sobre um possível aumento de casos de HAV, pois outros casos poderão ainda surgir devido às características do patogénico em questão (período de incubação longo e infetividade com doses baixas). Relativamente aos casos que provavelmente estão relacionados com frutas congeladas, é importante salientar que estas têm um prazo de validade longo, podendo estar bastante tempo armazenadas em casa do consumidor.

Os casos que não estão relacionados com fruta congelada podem ter que ver com o facto de o seu consumo não ser lembrado (este tipo de produtos pode ser utilizado como ingrediente menor, por exemplo como decoração de um outro produto). Por outro lado, pode ter que ver com infeções através de uma via secundária de infeção, como a contaminação cruzada ou transmissão pessoa para pessoa.

Várias autoridades alimentares recomendam que os cidadãos devem ferver todas as frutas congeladas antes do consumo. Também é recomendado a vacinação de indivíduos que contactem com pessoas infetadas, de forma a prevenir transmissões secundárias.

Quaisquer novos casos relacionados devem ser divulgados em EPIS-FWD, a fim de permitir um acompanhamento eficaz e partilha de informações.

A ECDC está também a recomendar a todos os Estados-Membros que apresentem um aumento de casos de HAV, que realizem o sequenciamento do ARN de HAV e que comparem os resultados com as sequências de surto disponíveis na EPIS-FWD ou na ECDC.

A ECDC e a Comissão Europeia, em cooperação com os países afetados e com a OMS, vão continuar a acompanhar de perto estes surtos e irão atualizar a avaliação do risco, assim que novas informações relevantes estejam disponíveis.

Outros surtos associados com hepatite A, e relacionados com hortofrutícolas, têm vindo a ocorrer ao longo dos anos em vários países da União Europeia. É o caso de tomates semi-secos, em 2009, na Austrália que envolveu 562 casos (Donnan *et al.*, 2012) e em 2010 em França com um total de 59 casos (Gallot *et al.*, 2011); em 2013 um surto na Turquia que envolveu 162 casos relacionado com romã (CDC, 2013; Food Safety News, 2013), e também em 2006 um surto na Finlândia relacionado com legumes e saladas envolveu 400 casos (Makary *et al.*, 2009).

Relativamente a surtos relacionados com bactérias patogénicas em hortofrutícolas, a lista é extensa, no entanto a Tabela 1.1 destaca alguns desses surtos.

**Tabela 1.1:** Surtos relacionados com hortofrutícolas e bactérias patogénicas ocorridos na União Europeia, entre 2004-2010.

<b>Patogénico</b>	<b>Ano</b>	<b>Produto</b>	<b>País de surto</b>	<b>Nº de casos</b>	<b>Referência</b>
<i>Salmonella newport</i>	2004	Alface	Irlanda	130	Irvine <i>et al.</i> , 2009
<i>Salmonella typhimurium</i>	2005	Alface congelada	Espanha	60	Takkinen <i>et al.</i> , 2005
<i>E. coli</i> O157:H7	2005	Alface	Suécia	135	Söderström <i>et al.</i> , 2008
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	2007	Alface embalada	Holanda e Islândia	50	Friesema <i>et al.</i> , 2008
<i>Staphylococcus aureus</i>	2009	Vegetais	Portugal	40	EFSA/ECDC, 2011
<i>Salmonella enteritidis</i>	2009	Batatas	Portugal	30	EFSA/ECDC, 2011
<i>Salmonella enteritidis</i>	2009	Morangos	Alemanha	26	EFSA/ECDC, 2011

<i>Salmonella enteritidis</i>	2010	Morangos	Alemanha	14	Mertens <i>et al.</i> , 2012
<i>E. coli</i> O104:H4	2011	Rebentos de soja	Alemanha	2987	EFSA, 2011a

### 1.3. Métodos de deteção de microrganismos

Analisar amostras alimentícias quanto à presença de bactérias patogénicas ou deteriorantes, fungos, toxinas ou vírus é uma prática padrão para garantir a segurança e a qualidade do alimento (Forsythe, 2002).

#### 1.3.1. Métodos de deteção de vírus da hepatite A em hortofrutícolas

Na maioria dos surtos de hepatite A relacionados com produtos frescos, o vírus raramente foi detetado no género alimentício devido à falta de métodos eficientes para detetar vírus em alimentos (Maurer, 2006).

Vários métodos de deteção do HAV em alimentos têm sido publicados na literatura científica, mas poucos foram realmente utilizados na análise de alimentos durante investigações de surtos, ou para a vigilância de rotina.

Praticamente todos os alimentos podem estar envolvidos na transmissão do vírus, mas existem certos tipos de alimentos que estão frequentemente associados a estes surtos, e portanto, são o principal alvo para o desenvolvimento de métodos de deteção. É o caso das frutas e vegetais.

Um dos primeiros desafios para a deteção de um vírus num alimento é a estratégia de amostragem, isto para que se possa escolher amostras representativas. O segundo passo é a escolha de um método sensível para o produto, visto que a concentração de um vírus num alimento é normalmente baixa (10-100 partículas virais infecciosas). Também o facto das partículas virais estarem muitas vezes apenas à superfície do produto é determinante, para além de outros fatores inerentes ao produto e até mesmo ao vírus, podem interferir na sua deteção (EFSA, 2011c; Stals *et al.*, 2012).

Ao contrário das bactérias patogénicas, os vírus não se replicam nos alimentos, fazendo com que o uso de técnicas microbiológicas tradicionais de análise de alimentos, em que existe um enriquecimento e seleção da cultura, sejam inaplicáveis no caso de deteção de

vírus. Por isso, um dos objetivos no desenvolvimento de métodos de detecção de vírus é, numa primeira fase, separar e concentrar o vírus eventualmente presente no alimento. Isto torna-se necessário para que exista um número de partículas virais relativamente grande de forma a assegurar a representatividade adequada da amostra, otimizando assim a sensibilidade do ensaio de detecção. Após separação e concentração do vírus, este é detetado através de técnicas moleculares (Maurer, 2006; Stals *et al.*, 2012)

De acordo com Baert *et al.* (2008), citado por Stals *et al.* (2012) os alimentos podem dividir-se em três categorias distintas, e conseqüentemente o processo de detecção será diferente. A primeira categoria é composta por alimentos à base de água, principalmente frutas e vegetais. A segunda categoria diz respeito a alimentos ricos em gorduras e à base de proteínas, principalmente produtos prontos-a-consumir. O marisco é considerado a terceira categoria, e, encontra-se numa categoria em separado, devido à acumulação e concentração de partículas virais e outros patogénicos no seu sistema digestivo (Stals *et al.*, 2012).

No caso particular de frutas e vegetais, um protocolo único, detalhado e internacionalmente aceite pode não ser adequado para todos os produtos desta categoria, sendo por vezes necessário fazer modificações a um protocolo base, dependendo do tipo de fruta ou vegetal, bem como tendo em conta a sua morfologia, interações hidrofóbicas, composição dos tecidos (que afetam as quantidades de substâncias inibidoras do método molecular, o pH e outras qualidades), e as condições de processamento (caso haja) a que os produtos foram submetidos (Crocì *et al.*, 2008).

No caso de frutas e vegetais, referente à primeira categoria, a detecção de vírus envolve, normalmente, três etapas:

- 1) Eluição e clarificação do vírus a partir do produto alimentar;
- 2) Concentração das partículas virais;
- 3) Extração de ácidos nucleicos e detecção molecular.

Durante o primeiro passo, as partículas virais são separadas a partir da matriz do alimento, e moléculas como polissacáridos, proteínas e ácidos gordos são removidos de forma a evitar a inibição da purificação do ácido nucleico a purificar (por exemplo ARN) e subsequente detecção molecular. De forma geral, nesta etapa, o alimento é lavado com um tampão apropriado (normalmente tampão alcalino ou neutro).

A concentração do vírus é também um passo importante uma vez que, como já foi referido, um vírus normalmente está presente no alimento em concentrações muito baixas,

sendo necessário aumentar essa concentração de forma a ser possível detetar a presença do mesmo. Esta etapa pode ser conseguida, por exemplo, através da adição de polietilenoglicol (PEG), ultracentrifugação ou ultrafiltração (Crocì *et al.*, 2008; EFSA, 2011c; Stals *et al.*, 2012).

Uma grande variedade de protocolos para eluição, clarificação e concentração de vírus da hepatite A em frutas e vegetais têm sido descritos na literatura. A Tabela 1.2 contém alguns exemplos de métodos já testados e publicados.

É importante referir que o HAV é um vírus de ARN, pelo que a deteção molecular dependerá de uma eficiente e eficaz purificação deste ácido nucleico, tarefa que é mais complicada do que a purificação de ADN.

Por fim a extração do ARN do vírus pode ser feita através de processos químicos ou com recurso a kits comerciais. Após esta fase, a amostra está pronta para deteção molecular através de RT-PCR (Reverse Transcription-PCR).

RT-PCR é uma técnica que envolve a **Reação da Transcriptase reversa (RT)**, seguida de **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. A partir do ARN, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de ADN complementar (cADN). Posteriormente, o cADN serve de molde na técnica de PCR (Maurer, 2006).

A técnica de PCR em si é já sobejamente conhecida e utilizada para deteção de microrganismos. Mais à frente são feitas algumas considerações e relembrados os princípios do PCR.

É importante referir que durante a deteção de vírus, resultados falsos-negativos, falsos-positivos, ou ambos podem ocorrer. Resultados falso-negativos podem ser causados por inibidores presentes no próprio alimento e, falsos-positivos podem ocorrer devido a contaminação cruzada. Por esta razão, os controlos positivos e negativos devem ser incluídos e são de extrema importância (Stals *et al.*, 2012).

**Tabela 1.2:** Exemplos de métodos publicados para extração de hepatite A em frutas e vegetais.

Produto	Método usado			Referência
	Eluição e clarificação		Concentração	
Frutas e vegetais	Tampão Tris-glicina, 3% extrato de carne, pH 9.5 Filtração		Precipitação com PEG-NaCl Clorofórmio:butanol	Dubois <i>et al.</i> , 2002
Varias bagas e vegetais	Tampão Tris-glicina, 1% extrato de carne, pectinase Filtração		Ultracentrifugação	Butot <i>et al.</i> , 2007
Vegetais e frutos	Tampão Tris-glicina, 1% extrato de carne, pH 9.5,		Precipitação com PEG-NaCl	Dubois <i>et al.</i> , 2007

vermelhos	pectinase Filtração	PBS Clorofórmio:butanol	
Bagas vegetais	Tampão glicina, Tris-HCl, 3% extrato de carne, pH 9.5, pectinase Filtração	Precipitação com PEG- NaCl PBS Clorofórmio:butanol	Baert <i>et al.</i> , 2008
Alface, fiambre, framboesa	Tampão Tris-HCl, glicina, 1% extrato de carne, pH 9.5, pectinase Filtração	Precipitação com PEG- NaCl PBS Clorofórmio:butanol	Scherer <i>et al.</i> , 2010
Frutos vermelhos	Tampão glicina, Tris-HCl, 3% extrato de carne, pH 9.5, pectinase Filtração	Precipitação com PEG- NaCl PBS Clorofórmio:butanol	Stals <i>et al.</i> , 2011

### 1.3.2. Métodos de deteção de bactérias patogénicas em produtos frescos

Os métodos para deteção de bactérias em alimentos, são frequentemente categorizados em dois grupos: convencionais (ou tradicionais) e rápidos. Os primeiros envolvem a homogeneização da amostra de alimento, etapas de enriquecimento, diluição em serie e inoculação em placas com ágar para formação de colónias, e posterior contagem das mesmas, sendo estes métodos quantitativos (UFC/g ou UFC/ml) (Forsythe, 2002; Gouvêa, 2009).

Os métodos rápidos são alternativos aos métodos convencionais e são projetados para obter um resultado final em menos tempo. Isto é altamente desejável na Indústria Alimentar, apesar das técnicas poderem ser mais caras inicialmente e requererem pessoal com alto nível de qualificações (Forsythe, 2002).

Os métodos convencionais requerem vários dias até obtenção de resultados, ao contrário da maioria dos métodos rápidos em que a deteção pode ser feita em algumas horas ou no máximo um dia. No entanto, algumas técnicas rápidas necessitam que se realize um enriquecimento prévio que pode variar de 6 a 48 horas, tornando assim a técnica um pouco mais morosa, como é o caso da técnica de PCR que será utilizada nesta investigação. A utilização de meios de enriquecimento é bastante vantajosa pois permite que bactérias presentes em reduzidas concentrações, possam multiplicar-se até quantidades possíveis de se detetar por métodos moleculares.

A principal desvantagem dos métodos rápidos face aos métodos tradicionais é que a maioria dos métodos rápidos pode danificar algumas células presentes (López-Campos *et al.*, 2012).

Croci *et al.* (2003) compararam a sensibilidade do método convencional com a da técnica de PCR (método rápido) na detecção de *Salmonella* sp. em produtos derivados de carne suína, bovina e de aves. Constataram que, mesmo em amostras pouco contaminadas experimentalmente, a técnica de PCR, ao contrário do método convencional, foi capaz de detetar a *Salmonella* sp. (Croci *et al.*, 2004).

Por outro lado, Santos *et al.* (2001) ao pesquisar *Salmonella* em carne de frango através de um método rápido (PCR) e um método tradicional, apesar de ter obtido a mesma sensibilidade nos dois métodos, o método rápido permitiu obter resultados em 48 horas (incluindo uma etapa de enriquecimento de 24 horas) e o método convencional demorou 96 horas (Santos *et al.*, 2001).

Também Shearer *et al.* (2001) avaliou um sistema baseado na reação em cadeia da polimerase para detecção de várias bactérias em fruta e vegetais frescos, e concluiu que o método de PCR permitiu a detecção, pelo menos, dois dias mais rápido do que os métodos convencionais (Shearer *et al.* 2001).

Gouvêa (2009) comprovou igualmente que a técnica de PCR tem vantagem em relação ao método convencional quanto ao período de tempo para obtenção de resultados, uma vez que, com o método convencional, foram obtidos resultados ao fim de 6-7 dias e com o método rápido de PCR foram obtidos resultados em 2-3 dias (Gouvêa, 2009).

Neste trabalho de investigação, foi utilizado um método de detecção rápido, nomeadamente a **Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)**. Para tal, numa primeira fase, a amostra foi homogeneizada e posteriormente incubada com um caldo de pré-enriquecimento (água peptonada tamponada) e só depois foi realizada a detecção através da técnica de PCR.

### **1.3.3. Técnica Molecular de PCR**

#### **1.3.3.1.Princípios e funcionamento**

A **Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)**, desenvolvida em 1984 por Kary Mullis, é uma técnica científica molecular simples, que se baseia na amplificação rápida de sequências específicas de determinado ADN, sendo por isso bastante utilizada na detecção de microrganismos em amostras de alimentos (Joshi, 2010).

Este método de detecção baseia-se numa reação enzimática, onde ciclos após ciclos, e em combinação com temperaturas específicas, é permitido fazer cópias do ADN alvo de modo a que este seja detetado posteriormente (Maurer, 2006).

O procedimento é o seguinte (Forsythe, 2002; Naravaneni e Jamil, 2005; Joshi, 2010):

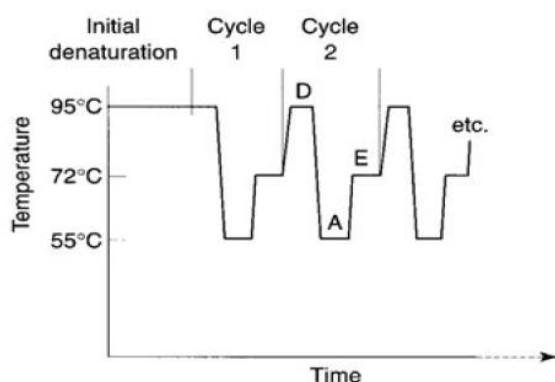
1 – A amostra é misturada com os reagentes necessários: enzima *Taq* DNA polimerase, os quatro nucleótidos constituintes do ADN (dNTP's), *primers* de iniciação (dependem do ADN alvo a detetar) e magnésio (cofator que é essencial para o funcionamento da *Taq* DNA polimerase);

2 – A mistura é aquecida a altas temperaturas (94°C) de forma a separar a dupla cadeia do ADN alvo – Fase de desnaturação (*Desnaturation*);

3 – A mistura é arrefecida até 40-55°C (temperatura de *annealing*<sup>3</sup> que depende dos *primers*) – Fase de emparelhamento dos *primers*. É nesta fase que os *primers* se ligam á sequencia complementar e a cadeias opostas no ADN alvo;

4 – A temperatura da reação é aumentada (72°C) para que ocorra a polimerização das novas cadeias complementares ao ADN alvo. Após os *primers* se ligarem, na etapa anterior, a *Taq* DNA polimerase estende as sequências iniciadoras ligando os nucleótidos entre si, completando assim as cadeias simples tornando-as duplas – Fase de extensão (*Extension*).

Estas etapas são repetidas inúmeras vezes (30 a 40) de forma a ser obtida uma amplificação exponencial do ADN alvo capaz de ser detetada posteriormente (Figura 1.6).



**Figura 1.6:** Ilustração dos ciclos de PCR. D – *Desnaturation*; A – *Annealing*; E – *Extension* (Joshi, 2010).

<sup>3</sup> A temperatura de *annealing* corresponde a  $\pm 5^\circ\text{C}$  abaixo da temperatura do *primer* que apresenta a temperatura mais baixa.

A **Reação em Cadeia da Polimerase**, apesar de permitir a rápida detecção de ADN alvo de bactérias patogénicas em alimentos, pode ser uma técnica imprecisa visto que pode amplificar também o ADN em células mortas (Passo, 2009; Liang *et al.*, 2011).

Liang *et al.* (2011) realizou um estudo que teve como objetivo investigar a estabilidade do ADN de células de *Salmonella* mortas em alface e desenvolver uma abordagem para a detecção de células viáveis de *Salmonella* em alface. Para tal foi utilizado o propídio monoazide (PMA), um corante que pode penetrar seletivamente as células bacterianas mortas. Amostras de alface inoculadas com células de *Salmonella* mortas ou viáveis foram tratadas, ou não, com PMA antes da extração do ADN. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com PMA impediu a amplificação por PCR de grande parte das células mortas (Liang *et al.*, 2011).

### **1.3.3.2. Condições que afetam o sucesso da técnica de PCR**

Enzimas, incluindo as polimerases que são utilizadas na reação de PCR, devem ter condições químicas específicas de modo a fazerem um “trabalho” eficaz. Se as condições não forem ótimas para o seu funcionamento, a polimerase pode não ser capaz de sintetizar ADN suficiente para que a reação seja positiva, são assim chamados de resultados “falsos-negativos”, pois são causados pela inibição. Outras situações podem causar este tipo de resultados como a utilização de *primers* incorretos, a composição do tampão, a concentração de nucleótidos (dNTP's), a incorreta temperatura de *annealing* utilizada, o número de ciclos demasiado pequeno, entre outras possibilidades (Maurer, 2006).

Por outro lado podem também ocorrer resultados “falsos-positivos”, que ocorrem quando existe contaminação cruzada durante o processo de detecção, ou quando uma grande quantidade de células mortas, que não provocam infeção, é detetada.

De forma a combater este tipo de resultados, é importante incluir na técnica de PCR um controlo positivo, em que é utilizado um modelo de ADN conhecido, e dois controlos negativos, um sem ADN, funcionando como controlo à reação de PCR, de forma a verificar se a mistura reacional está contaminada, e outro utilizando ADN de um organismo diferente daquele que se pretende detetar, determinando assim a especificidade dos *primers*.

Desta forma, é importante otimizar a técnica de PCR, testando os vários reagentes e temperaturas, antes de efetuar a detecção pretendida (Maurer, 2006; Stals, 2012).

A reação de PCR pode ser inibida quando substâncias (inibidores) se ligam ou degradam um componente da reação, impedindo-o de participar na síntese de ADN.

O verdadeiro desafio da técnica de PCR é o isolamento do agente patogénico e/ou do seu ADN diretamente a partir de uma matriz alimentar, pois a grande variedade de produtos alimentares complica qualquer tentativa de produzir um protocolo único de preparação da amostra.

Inibidores de PCR são encontrados em praticamente todo o tipo de alimentos, e têm efeitos variáveis na reação de PCR. De forma geral, eles tornam mais difícil a deteção de um baixo número de células bacterianas ou vírus. Portanto, um bom protocolo de preparação da amostra irá concentrar-se na recolha do patogénico e na remoção de inibidores presentes no alimento (ou no meio de cultura) e assim obter melhores resultados após o PCR (Maurer, 2006).

Caldos de enriquecimento e agares seletivos contêm substâncias que inibem a técnica de PCR, e por isso é importante lavar as células usando a centrifugação, remoção do sobrenadante e ressuspensão das células em soro fisiológico ou água estéril (ou um tampão de equilíbrio) (Maurer, 2006).

### **1.3.3.3.Preparação da amostra**

Como em qualquer outro protocolo, a preparação das amostras é um passo fundamental para o sucesso da técnica de PCR, e varia consoante o patogénico a detetar e o tipo de amostra.

O primeiro desafio na escolha de um bom protocolo de preparação da amostra é o de saber se o patogénico contamina o alimento em estudo em níveis elevados ou, se será necessário amplificar as bactérias com uma etapa de enriquecimento com meio de cultura. Assim, além de haver um aumento do número de microrganismos alvo, há um aumento de sensibilidade de deteção, e uma ajuda na redução do risco de amplificação de ácidos nucleicos de células mortas ou não viáveis. No caso das células mortas, os enriquecimentos permitem que só as células vivas sejam alvo de deteção, evitando resultados falsos-positivos. No caso de células viáveis, mas não cultiváveis, estas podem causar infeção, e apesar de não serem detetadas nos enriquecimentos, podem sê-lo por PCR, apresentando assim mais uma vantagem na utilização desta técnica (Santos *et al.*, 2001; Naravaneni e Jamil, 2005; Passo, 2009).

Estes pré-enriquecimentos, levam a que as bactérias sejam detetadas mais rapidamente por PCR, do que por métodos bacteriológicos *standard*, isto porque se tratam de resultados qualitativos (presença/ausência) e não quantitativos (UFC/g ou UFC/ml). Este fator torna a escolha da amostra ainda mais importante, visto que só o facto de o organismo estar presente é relevante, independentemente da quantidade de células (Maurer, 2006; Passo, 2009).

Após a recolha do agente patogénico é necessário um passo de lise (rutura) das células, de forma a libertar os ácidos nucleicos. Apesar de existirem protocolos básicos para proceder a essa rutura, organismos específicos podem requerer protocolos específicos, pois a sua eficácia depende de vários aspetos relacionados com a parede celular bacteriana.

Bactérias Gram-negativas não possuem uma parede celular espessa, portanto o calor, ou um reagente específico é suficiente para promover a rutura das células. Por outro lado, bactérias Gram-positivas têm uma parede celular espessa que deve ser quebrada, com o auxílio de reagentes específicos, para uma rutura eficaz das células (Maurer, 2006).

O passo seguinte no processamento da amostra é reduzir a concentração de possíveis inibidores de PCR. O procedimento dependerá da qualidade de ADN pretendida e da composição de inibidores presentes na amostra. Exemplo de redução de inibidores é a extração com fenol/clorofórmio, seguida de precipitação com etanol ou propanol. Salienta-se o facto de já existirem kits de extração de ADN específicos para amostras alimentares, levando também à eliminação, de forma fácil, de potenciais inibidores.

O mais importante é utilizar um protocolo eficaz para o alimento e microrganismo em questão (Maurer, 2006).

Após esta etapa, a técnica de PCR poderá ser executada para os agentes patogénicos de interesse.

#### **1.3.3.4. Eletroforese em Gel de Agarose**

A deteção dos fragmentos produzidos durante a técnica de PCR pode ser feita de várias formas. Uma delas, a mais comum, é a colocação das amostras de PCR em gel de agarose, sendo os fragmentos, se presentes, separados por uma corrente elétrica e com base no tamanho dos mesmos. Ao gel de agarose é adicionado um corante que se liga à dupla cadeia de ADN, originando fluorescência quando sujeito à luz ultravioleta.

O equipamento utilizado é uma tina de eletroforese e possui dois elétrodos: um negativo e outro positivo, capazes de gerar um campo elétrico. Desta forma as moléculas são colocadas num suporte (gel de agarose) e migram para o polo que as atrai. Moléculas de ADN possuem carga negativa e portanto ao serem submetidas ao campo elétrico, migram em direção ao elétrodo positivo (Lee *et al.*, 2012).

O tamanho e a forma das moléculas influenciam na velocidade com a qual a molécula migrará no gel. Quanto maior o tamanho e quanto mais complexa a forma, mais tempo demorará para que a molécula se movimente em direção ao polo de atração. Também outros parâmetros como a percentagem de agarose utilizada no gel, ou o tempo de eletroforese, influenciam a separação dos fragmentos. Quanto mais concentrado o gel de agarose, mais “apertados” os poros e conseqüentemente mais difícil a migração de moléculas de ADN (Lee *et al.*, 2012, Naravaneni e Jamil, 2005).

Na interpretação dos resultados desta técnica, podemos dizer que uma amostra é positiva quando um fragmento é produzido, com o tamanho esperado, de acordo com os *primers* utilizados. Se o tamanho gerado for superior ou inferior ao esperado, a amostra deverá ser negativa (amplificação não específica), podendo isto indicar contaminação por ADN exógeno na reação de PCR, uso de temperaturas não específicas, entre outras possibilidades. (Forsythe, 2002).

Para ser possível visualizar facilmente o tamanho dos fragmentos gerados, é utilizado um marcador de pesos moleculares *standard*, que funciona como padrão (uma amostra já conhecida que funciona como controlo positivo).

#### **1.4. Objetivos do trabalho**

Tendo consciência da problemática ao nível da Segurança Alimentar de produtos hortofrutícolas, o objetivo deste trabalho consistiu no estudo da ocorrência de cinco microrganismos patogénicos: *Salmonella* sp.; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; HAV (vírus da Hepatite A), em dois tipos de produtos à escolha (framboesas e alface) à venda no mercado português, avaliando-se desta forma a sua inocuidade.

Este estudo teve também como propósito, otimizar uma técnica simples e rápida para a deteção desses microrganismos nesse tipo de produtos.

Também no presente trabalho foi ainda realizado um estudo sobre hábitos de consumo de produtos hortofrutícolas minimamente processados, de framboesas e alface através de um inquérito por questionário como instrumento de recolha de informação e divulgado *online*.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Detecção de hepatite A em framboesas e alface

Para a deteção do HAV em framboesas e alface, foram experimentados dois tipos de métodos distintos.

- O primeiro método teve como base um procedimento baseado no protocolo genérico “*Qualitative detection of norovirus and hepatitis A virus in soft fruit*” publicado em 2012 por “The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (Cefas)”, sendo este compatível com a Norma “*CEN ISO/TS 15216-2: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection*”(Cefas, 2012). Este protocolo, já referido brevemente no ponto 1.3.1 da introdução, baseia-se na deteção realizada em três etapas principais. Uma primeira etapa de eluição e clarificação, uma segunda etapa de concentração e por fim a extração do ácido nucleico (RNA) e posterior deteção molecular (PCR). De forma geral, numa primeira fase a amostra é eluída com tampão Tris-glicina, é adicionado extrato de bife e pectinase. Após incubação e centrifugação, é adicionado PEG/NaCl, e, novamente é realizada uma incubação e posterior centrifugação. Por fim é adicionado ao *pellet* PBS e clorofórmio:butanol e, após incubação e nova centrifugação, a fase aquosa está pronta para a etapa de extração do ácido nucleico, com recurso a um kit comercial, e posterior deteção molecular.
- O segundo método testado teve como base a purificação total de ARN, e foram experimentados três protocolos distintos:
  - No primeiro protocolo realizado recorreu-se a um kit comercial (*RNA Spin Mini* da GE Healthcare), seguindo-se as indicações do fornecedor.
  - O segundo protocolo experimentado teve por base o protocolo “*Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform*” (2011) descrito por Joseph Sambrook e David W. Russell (Sambrook e Russel, 2006). Neste protocolo, a amostra é eluída com um tampão de extração (NaOAc, EDTA e SDS), após centrifugação é adicionado fenol e clorofórmio/álcool isoamílico. Após nova centrifugação é adicionado LiCl e posteriormente a amostra é arrefecida e

centrifugada. É adicionado novamente LiCl, numa concentração mais baixa, nova centrifugação e lavagem do *pellet* com NaOAc e etanol.

- Por fim o terceiro protocolo partiu igualmente de uma extração inicial de ARN e baseou-se no artigo “*A simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees*” de Chang *et al.* (Chang *et al.*, 1993), e foi experimentado sem que se tenham feito alterações ao protocolo descrito. Resumidamente, neste protocolo, a amostra é eluída com um tampão de extração (CTAB, PVP, Tris-HCl, EDTA, NaCl, espermidina e  $\beta$ -mercaptoetanol), é adicionado posteriormente clorofórmio/álcool isoamílico seguido de centrifugação e adição de LiCl. Após incubação *overnight* e centrifugação é adicionado uma solução SSTE (NaCl, SDS, Tris-HCl e EDTA) e, novamente, o *pellet* é lavado com clorofórmio/álcool isoamílico. É feita nova incubação, nova centrifugação e lavagem do *pellet* em etanol.

## **2.2.Deteção de bactérias patogénicas em framboesas e alface**

Numa primeira fase as amostras de framboesas e alface recolhidas foram aleatórias e sem qualquer interesse particular. Posteriormente à otimização da técnica, foram escolhidas, para análise, três marcas de framboesas (frescas e congeladas) e três marcas de alface (inteira fresca e embalada fresca) diferentes à venda em supermercados portugueses.

### **2.2.1. Preparação da amostra**

Na presente investigação, a preparação das amostras foi iniciada com a homogeneização das mesmas com água peptonada tamponada, após pesagem de 2,5 gramas de amostra. A amostra foi colocada num saco estéril e homogeneizada durante 10 minutos no *Stomacker*. Seguiu-se uma etapa de pré-enriquecimento, novamente com água peptonada tamponada, durante aproximadamente 12-24h a 37°C.

Como já foi referido, em bactérias Gram-negativas, como a *Salmonella* sp. e *E. coli*, o ADN é, normalmente, facilmente extraído com fervura. Assim, para todas as bactérias em estudo foram testadas duas formas de preparação da amostra:

- Uma que envolveu a lavagem das células, após recolha das mesmas por centrifugação (11000 rpm, 2 minutos, temperatura ambiente); o *pellet* obtido foi depois ressuspenso e submetido a fervura durante 15 minutos, seguido de 5 minutos no gelo; seguiu-se

nova centrifugação (13000 rpm, 2 minutos, temperatura ambiente) e o sobrenadante resultante foi usado para a reação de PCR que se seguiu.

- Na segunda forma de preparação da amostra, apenas se recolheu algum volume da cultura de pré-enriquecimento, tendo-se usado a mesma diretamente para a reação de PCR.

### 2.2.2. Reagentes, *primers* e condições de PCR utilizadas

Os reagentes de PCR utilizados estão descritos na Tabela 2.1 quanto à sua concentração. O volume de cada reagente variou consoante o tipo de teste e as amostras a analisar.

**Tabela 2.1:** Reagentes utilizados na preparação da Master Mix necessária para as reações de PCR.

Reagentes	Concentração
Tampão de reação	10X
dNTP's	2mM
MgCl <sub>2</sub>	25mM
<i>Taq</i> DNA Polimerase	5U/μl
<i>Primer Forward</i>	2μM
<i>Primer Reverse</i>	2 μM

Os *primers* utilizados para a deteção de cada microrganismo encontram-se descritos na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2:** Identidade e especificidades dos *primers* dos diferentes microrganismos.

Microrganismo	Nome	Sequência	Gene	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>Salmonella</i> sp.	IpaB-F	5- GGACTTTTAAAA GCGGCGG-3	ipaB	314	Kong <i>et al.</i> , 2001
	IpaB-R	5- GCCTCTCCCAGAG CCGTCTGG-3			
<i>Escherichia coli</i>	PathEcoliFwd	5-TGA CCA CAC GCT GAC GCT GAC CA-3	malB	306	Rompré <i>et al.</i> , 2002
	PathEcoliRev	5-TTA CAT GAC CTC GGT TTA GTT CAC AGA-3			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staph.au-fwd	5-CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG-3	Sea	127	Becker <i>et al.</i> , 1998

	Staph.au-rev	5-TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C-3			
<i>Listeria monocytogenes</i>	List.mono-fwd	5- GCT AAT ACC GAA TGA TAA GA - 3	16S rRNA	457	Cocolin <i>et al.</i> , 2002
	List.mono-rev	5- AAG CAG TTA CTC TTA TCC T-3			

Ao longo da investigação, foram testadas diferentes temperaturas de *annealing* e número de ciclos, estando as condições que melhores resultados apresentaram, descritas na Tabela 2.3.

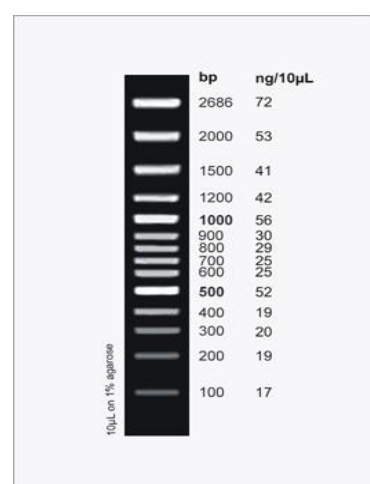
**Tabela 2.3:** Melhores condições de PCR (temperatura de *annealing* e número de ciclos) determinadas.

Microrganismos	Condições de PCR	
	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Número de ciclos
<i>Salmonella sp.</i>	55	35
<i>Staphylococcus aureus</i>	41	40
<i>Listeria monocytogenes</i>	40	40
<i>Escherichia coli</i>	48	35

### 2.2.3. Eletroforese em gel de agarose

Todos os géis de agarose utilizados foram preparados numa concentração de 2% (m/v) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). Depois de colocado num suporte com o pente que contém o número de poços necessários, o gel é deixado a solidificar e só depois é colocado na tina de eletroforese, que contém tampão TAE. As amostras de cada reação de PCR, incluindo o marcador de pesos moleculares (Figura 2.1), antes de colocadas no gel, são misturadas com *loading buffer*, uma substância que dá peso e cor às amostras.

Durante a corrida do gel, foi utilizada uma voltagem constante de 90 V, durante aproximadamente 40 minutos. Após a corrida o ADN foi observado recorrendo ao aparelho GelDoc (BroRAD Gel Doc XR) e os resultados devidamente registados.



**Figura 2.1:** Marcador de pesos moleculares usado.

#### 2.2.4. Otimização do método de detecção

Antes de analisar as amostras pretendidas, ou seja, alface e framboesas à venda no mercado português, foi necessário otimizar a técnica de detecção dos diferentes microrganismos. Para tal foram realizados vários testes: extração de ADN dos microrganismos; quantificação do ADN genómico extraído dos microrganismos com recurso a um kit comercial; pureza e eficiência dos reagentes utilizados no PCR; especificidade dos *primers* usados; sensibilidade dos *primers* para diferentes concentrações de ADN dos diferentes microrganismos; extração de ADN de framboesas e alface com recurso a um kit comercial; sensibilidade do método de detecção usado, variando a concentração “adicionada” de microrganismos; quantificação do número de células viáveis nas culturas de microrganismos usadas.

#### Extração de ADN dos microrganismos

O ADN de cada microrganismo em estudo foi extraído de forma a obtermos um controlo positivo para as reações de detecção por PCR. Essa extração foi realizada através do kit de extração “G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit [For Cell/Tissue] (iNtRON Biotechnology)” de acordo com o descrito no protocolo do fornecedor.

#### Quantificação do ADN genómico extraído dos microrganismos com recurso a um kit comercial

Numa primeira fase, após a obtenção do ADN genómico de cada bactéria com recurso ao kit comercial, foi realizada a sua quantificação com o objetivo de verificar a viabilidade do kit e a quantidade de ADN extraído. Para tal, o ADN extraído foi quantificado por espectrofotometria através da leitura da densidade ótica (DO) a 260nm.

Para fazer a leitura no espectrofotómetro, o ADN foi diluído, e após a leitura, a concentração de ADN foi estimada tendo em conta a seguinte relação: 1 DO<sub>260nm</sub> = 50µg/ml ADN.

Dessa forma, a concentração de ADN na amostra foi obtida pelo seguinte cálculo:

$$[ADN] \mu g/ml = Valor da leitura (DO_{260nm}) \times 50 \times Factor de diluição$$

## Pureza e eficiência dos reagentes utilizados na técnica de PCR

De forma a garantir que todos os componentes necessários para a realização da técnica de PCR estavam funcionais, foram testados os *primers*, a *Taq* DNA Polimerase, e a água estéril utilizada.

Para tal, foram feitas quatro reações, variando-se a presença/ausência dos reagentes, como demonstrado na Tabela 2.4, tendo como exemplo o caso de detecção de *Salmonella* sp. Às diferentes reações foi feito o PCR e os resultados obtidos visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2%.

**Tabela 2.4:** Quantidade ( $\mu$ l) dos diferentes componentes a misturar para as diferentes reações a testar, por meio de detecção molecular, para detecção de *Salmonella* sp.

Reações	Primer fwd ( $\mu$ l)	Primer rev ( $\mu$ l)	Master Mix ( $\mu$ l)	Água estéril ( $\mu$ l)	Tap DNA Polimerase ( $\mu$ l)
SLneg1	0,75	0	13,2	0,75	0,3
SLneg2	0	0,75	13,2	0,75	0,3
SLneg3	0,75	0,75	13,2	0,3	0
SLpos	0,75	0,75	13,2	0	0,3

Nota: Uma vez que foi adicionado 0,3  $\mu$ l de *Taq* DNA Polimerase (5U/ $\mu$ l), isso significa que foram adicionadas 1,5U.

## Especificidade dos *primers* usados

Para além de testar a eficiência dos *primers*, estes foram testados igualmente quanto à sua especificidade. Para tal foram realizadas reações de PCR de forma a verificar se os *primers* desenhados para o ADN de determinado microrganismo amplificariam bandas quando se usa ADN de outros microrganismos. A Tabela 2.5 demonstra o exemplo para a detecção de *Salmonella* sp.

**Tabela 2.5:** Exemplo do teste à especificidade dos *primers* usados para a detecção de *Salmonella* sp.

Master Mix + <i>Primers</i> <i>Salmonella</i> sp.	+ ADN <i>Staphylococcus aureus</i>
	+ ADN <i>Listeria monocytogenes</i>
	+ ADN <i>Escherichia coli</i>
	+ ADN <i>Salmonella</i> sp.

## Sensibilidade dos *primers* para diferentes concentrações de ADN dos diferentes microrganismos

De modo a determinar qual a concentração de ADN que cada par de *primers* é capaz de detetar, foram testadas seis concentrações diferentes de ADN genómico (extraído com o kit

comercial) de cada microrganismo, de acordo com a Tabela 2.6 e dando uma vez mais o exemplo da detecção de *Salmonella* sp.

**Tabela 2.6:** Exemplo para a detecção de *Salmonella* sp., do teste à sensibilidade dos *primers* para diferentes concentrações de ADN dos diferentes microrganismos.

<b>Reação</b>	<b>Produto</b>	<b>Inóculo</b>	<b>Primers</b>
1	ADN de <i>Salmonella</i> sp.	Concentração [C]	<i>Primers</i> de <i>Salmonella</i> sp.
2		Concentração [C/5]	
3		Concentração [C/10]	
4		Concentração [C/15]	
5		Concentração [C/20]	
6		Concentração [C/25]	

Após visualização dos resultados em eletroforese em gel de agarose 2%, o ADN, da concentração mínima detetável, foi quantificado por espectrofotometria. Para tal foi lida a densidade ótica a 260nm.

As leituras referentes à DO de 260nm permitem, como já foi referido, determinar a concentração de ADN presente.

#### **Extração de ADN de framboesas e alface com recurso a um kit comercial**

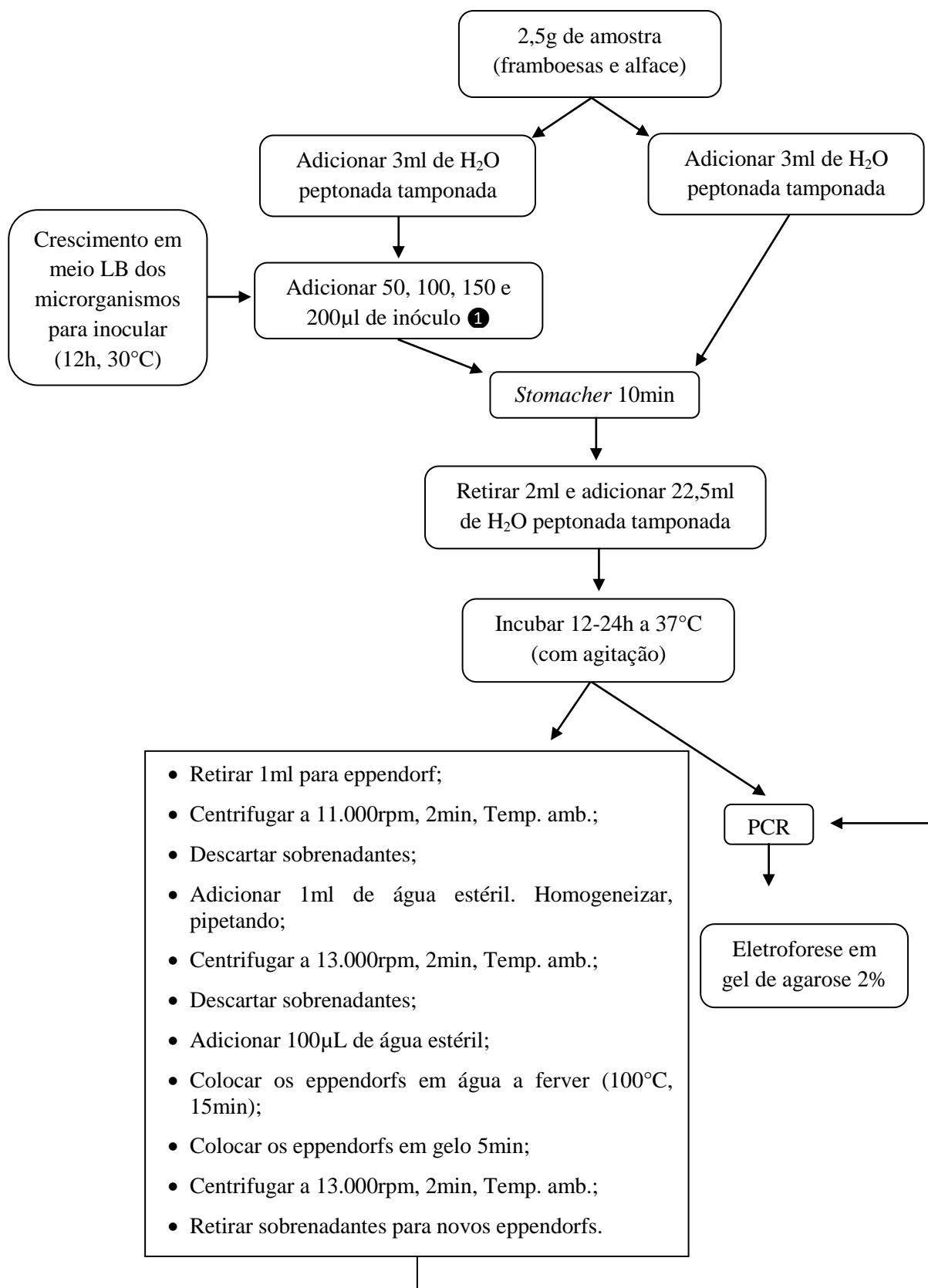
O ADN de framboesas e alface foi extraído recorrendo ao kit de extração “E.Z.N.A.® Plant DNA Kit Protocols – Fresh/Frozen Plant Samples” de acordo com o protocolo do fornecedor.

O ADN obtido foi quantificado através de espectrofotometria.

#### **Sensibilidade do método de detecção usado, variando a concentração “adicionada” de microrganismos**

De forma a testar a técnica, amostras de framboesas e alface foram inoculadas artificialmente com os microrganismos em estudo (com diferentes volumes – 0, 50, 100, 150 e 200µl de uma suspensão crescida *overnight*) e, como já foi referido, dois métodos foram testados de forma a verificar qual a forma de preparação que resultaria numa melhor amostra a analisar por PCR. Um método de preparação em que a amostra inoculada foi submetida a um processo de rebentamento de células por fervura, e outro método de preparação em que uma suspensão celular é usada diretamente na reação de PCR.

O esquema do procedimento realizado encontra-se na Figura 2.2.



**Figura 2.2:** Procedimento realizado para o teste à sensibilidade do método de detecção usado, variando a concentração “adicionada” de microrganismos.

### **Quantificação do número de células viáveis nas culturas de microrganismos usadas**

As culturas de bactérias a usar para inocular “artificialmente” as amostras de framboesas e alface, foram crescidas em caldo LB (cerca de 3 ml), durante aproximadamente 12h a 30°C.

Para determinar o número de células viáveis (UFC) nas culturas de microrganismos a usar na contaminação “artificial” de framboesas e alface (passo indicado com ❶ na Figura 2.2), realizou-se o seguinte procedimento:

A amostra foi submetida a diluições decimais sequenciais, seguida de espalhamento em meio PCA, ou NA, de 100µl de cada uma das diluições. Das diluições maiores foram feitas 3 réplicas dos espalhamentos referidos. As placas foram incubadas a 30°C durante 24h, e o número de colónias contadas.

Com o valor obtido do número de colónias, determinou-se o número de UFC através da fórmula:

$$M = \frac{\sum \text{Colónias}}{V[n1 + (0,1 \times n2)]} \times \frac{1}{d}$$

Em que:

V – Volume inoculado na placa (0,1ml)

n1 – Número de placas da menor diluição

n2 – Número de placas da maior diluição

d – fator de diluição correspondente à menor diluição

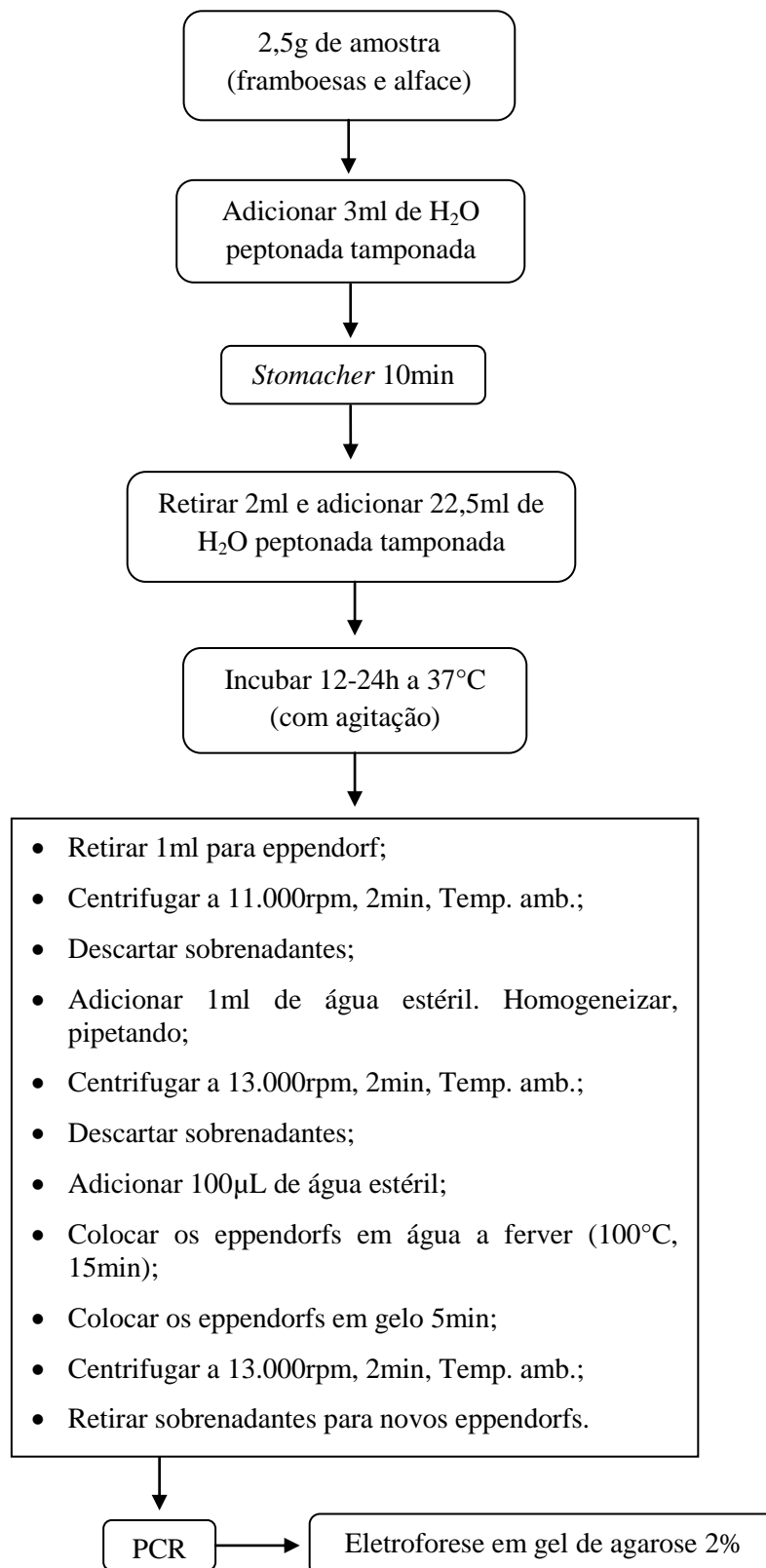
### **Análise de amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português**

Após otimização da técnica, para os diferentes microrganismos em estudo, amostras de framboesas (congeladas e embaladas frescas) e alface (embalada fresca e fresca) à venda no mercado português foram analisadas (Tabela 2.7).

As amostras foram homogeneizadas e incubadas durante 12-24h a 37°C com água peptonada tamponada, foi feito o passo de rebenamento de células baseado na fervura, foi realizado a técnica de PCR (com e sem *Taq* DNA polimerase) com as temperaturas de *annealing* e número de ciclos ideais para a deteção de cada microrganismo em estudo, e as amostras observadas em gel de agarose 2%. O esquema do procedimento realizado encontra-se na Figura 2.3.

**Tabela 2.7:** Identificação das amostras de framboesas e alface analisadas à venda no mercado português.

	<b>Produto analisado</b>
<b>Framboesas</b>	<b>Marca A:</b> Embaladas frescas Origem: Espanha
	<b>Marca B:</b> Congeladas Origem: Fabricado na EU
	<b>Marca C:</b> Congeladas Origem: sem indicação
<b>Alface</b>	<b>Marca D:</b> Embalada fresca Origem: Portugal
	<b>Marca E:</b> Fresca Origem: Portugal
	<b>Marca F:</b> Embalada fresca Origem: Portugal



**Figura 2.3:** Procedimento realizado para análise de amostras de framboesas e alface à venda no mercado português.

### **2.3. Inquérito de consumo alimentar**

De forma a conhecer um pouco os hábitos de consumo de hortofrutícolas minimamente processados, framboesas e alface, foi desenvolvido um inquérito por questionário devidamente estruturado e divulgado *online*. Para o presente estudo, o *software* utilizado para a construção e aplicação do questionário *online* foi o Google Docs (<http://docs.google.com>).

O questionário elaborado é constituído por 14 perguntas, 8 fechadas (em que o inquirido seleciona uma resposta de entre as opções proporcionadas) e 6 semifechadas (em que existe a possibilidade de indicação de uma outra alternativa à escolha). Este foi estruturado em três partes: 1 – Caracterização do inquirido; 2 – Avaliação do consumo de hortofrutícolas minimamente processados; 3 – Avaliação do consumo de framboesas e alface (Anexo I).

O questionário foi disponibilizado *online* no período de 5 de Julho a 25 de Agosto de 2014, sendo as respostas obtidas registadas para posterior análise.

#### **2.3.1. Definição da Amostra**

Amostra é um subconjunto obtido de uma população específica e homogénea e por isso representativa do mesmo. Esta deve ser constituída em função do objetivo a alcançar, das dificuldades que se podem encontrar e da capacidade em aceder à população a estudar (Fortin, 1999).

Considerou-se que era fundamental garantir que a dimensão da amostra, resultante do processo de inquirição, permitiria extrapolar conclusões para o universo, ou seja, que a amostra seria representativa do universo em causa.

Neste sentido, determinou-se a dimensão da amostra, considerando a amostragem aleatória simples, em que qualquer elemento individual da população tem a mesma probabilidade de ser selecionado (Morais, 2005).

Assim, a dimensão da amostra, na presente investigação, irá depender:

- Da amplitude máxima de erro (E) pretendida para o intervalo de confiança. Os valores são usualmente inferiores a 0,05, não excedendo os 0,1;
- Do grau de confiança do intervalo. Os graus de confiança, normalmente expressos em percentagem, mais utilizados são 90%, 95% e 99% e, conseqüentemente, as

probabilidades de erro ( $\alpha$  ou nível de significância) são, respetivamente, de 0,1, 0,05 e 0,01;

- Da dispersão do atributo na população. Este é um fator não controlável, o que implica que para determinar a dimensão da amostra para um dado nível de precisão desejado, deve-se considerar a dispersão máxima, ou seja, considerar que 50% dos indivíduos têm o atributo ( $p$ ) e os restantes 50% não possuem o atributo ( $q = 1 - p$ );
- Da dimensão da população. Este é, igualmente, um fator não controlável, uma vez que o seu conhecimento pode ser inacessível. Neste caso, e como acontece neste estudo, considera-se que a dimensão da população é tendencialmente infinita.

Deste modo, a dimensão mínima da amostra foi calculada através da seguinte fórmula:

$$n = \frac{(Z_{(1-\frac{\alpha}{2})})^2 \times p \times q}{E^2}$$

Em que:

$E$  – Amplitude máxima de erro (diferença entre a estimativa e o parâmetro) é de 7,2%;

$Z_{(1-\alpha/2)}$  – Valor crítico da distribuição normal padrão é de 1,96 (o que corresponde a um grau de confiança de 95%);

$p$  – Valor estimado da proporção dos indivíduos que possui o atributo é de 50%;

$q$  – Valor estimado da proporção dos indivíduos que não possui o atributo ( $1-p$ ) é de 50%.

Da aplicação da fórmula, teremos:

$$n = \frac{(1,96)^2 \times 0,5 \times 0,5}{0,072^2} \leftrightarrow n = 186 \text{ indivíduos}$$

Por conseguinte, no presente estudo foram inquiridos 186 indivíduos, podendo considerar-se que a dimensão da amostra obtida foi estatisticamente significativa e representativa para um grau de confiança de 95% e uma margem de erro de 7,2%.



### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Detecção do vírus da hepatite A em framboesas e alface

Após a realização de uma etapa de concentração das partículas virais conforme no protocolo “*Qualitative detection of norovirus and hepatitis A virus in soft fruit*” publicado em 2012 por “The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (Cefas) (Cefas, 2012), fase onde se pretendia que o ARN viral fosse precipitado, verificou-se a não ocorrência de precipitação. Por essa razão, foram experimentados outros protocolos por forma a conseguir purificar o ARN viral.

Aquando utilizado o kit comercial “*RNA Spin Mini*” da GE Healthcare para purificação total de ARN, foi, no final do procedimento, corrido um gel de agarose de forma a verificar se a banda correspondente ao ARN seria visível. No entanto não foi observada qualquer banda, pelo que se decidiu abandonar igualmente a utilização deste protocolo.

Uma segunda tentativa de purificação total de ARN experimentada foi baseada no protocolo “*Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform*” (Sambrook e Russel, 2006) e, uma vez mais, aquando da precipitação, não se verificou a ocorrência de qualquer precipitado.

Por último, um terceiro protocolo que partiu igualmente para a extração total de ARN, com base no artigo “*A simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees*” (Chang *et al.*, 1993), foi testado, não se conseguindo também obter uma precipitação do ARN total.

A deteção de vírus em alimentos, principalmente em alimentos que contêm elevado teor de água, como é o caso dos frutos vermelhos e alface, é um processo difícil, pois para além dos inibidores que os mesmos contêm (polissacáridos, proteínas e ácidos gordos), os vírus encontram-se em quantidades muito baixas, sendo que qualquer contaminação que possa ocorrer durante a sua purificação poderá danificar o ARN e torna-lo indetetável. O facto de não ser possível obter um controlo positivo, uma vez que não nos foi possível manipular um outro vírus, também dificultou a otimização da técnica, já que poderíamos ter experimentado e comprovado a eficiência das técnicas em uso. Desta forma, devido à falta de meios e tempo para continuar a otimizar a técnica de deteção do HAV, esse objetivo foi

abandonado, passando o objetivo principal a ser a pesquisa de bactérias patogénicas usando um método rápido e fiável, de origem molecular.

### 3.2.Otimização do método de deteção

São de seguida apresentados e discutidos os resultados obtidos nos testes que foram executados para otimizar a técnica de deteção.

#### 3.2.1. Quantificação do ADN genómico extraído dos microrganismos com recurso a um kit comercial

**Tabela 3.1:** Valores de absorvância (260nm) e concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) de ADN dos diferentes microrganismos utilizados.

<b>Organismo</b>	<b>Abs (260nm)</b>	<b>[ADN] <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
<i>Salmonella</i> sp.	0,002	2
<i>E. coli</i>	0,007	7
<i>S. aureus</i>	0,017	17
<i>L. monocytogenes</i>	0,0036	36

Após a extração do ADN de cada microrganismo com recurso a um kit comercial, de forma a obtermos um controlo positivo para cada bactéria, e posterior quantificação por espectrofotometria, verificou-se que para todos os microrganismos o kit funcionou na extração do ADN.

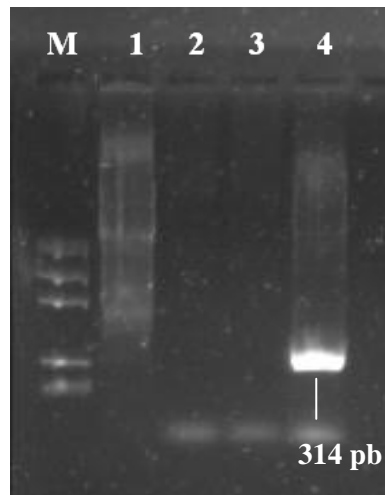
A concentração de ADN de *L. monocytogenes* é a mais elevada (36  $\mu\text{g/ml}$ ), seguindo-se *S. aureus* (17  $\mu\text{g/ml}$ ), *E. coli* (7  $\mu\text{g/ml}$ ) e, notoriamente numa concentração mais baixa, *Salmonella* sp. (2  $\mu\text{g/ml}$ ).

Embora no protocolo do fornecedor fosse sugerido um tratamento diferencial, caso se tratassem de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, não foi por nós identificado um padrão de purificação diferente com base nessa característica. Pensamos no entanto, que a densidade celular das culturas de *E. coli* e *Salmonella* sp. era menor do que a das restantes culturas, daí o menor rendimento obtido nesta purificação.

### 3.2.2. Pureza e eficiência dos reagentes utilizados na técnica de PCR

Relativamente à avaliação da pureza e eficiência dos reagentes utilizados nas reações de PCR, exemplificada na Tabela 2.4, será de esperar que apenas a reação que contém todos os reagentes (reação do poço 4) apresente amplificação.

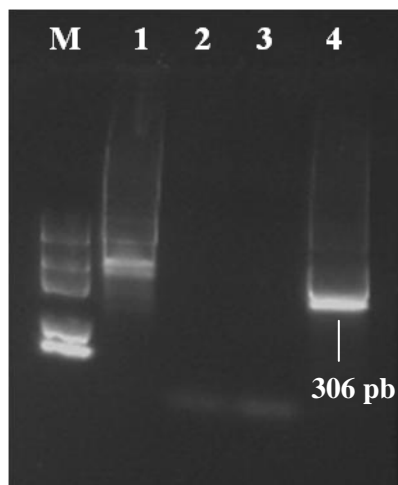
#### *Salmonella* sp.



**Figura 3.1:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes ao teste de pureza e eficiência dos reagentes utilizados no PCR para detecção de *Salmonella* sp., em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 - SLneg1 (ausência de *primer reverse*); 2 – SLneg2 (ausência de *primer forward*); 3 – SLneg3 (sem *Taq* DNA polimerase); 4 – SLpos (reação teste, com todos os reagentes).

No caso de *Salmonella* sp., efetivamente apenas a reação do poço 4 apresentou amplificação, e no tamanho esperado (314pb, conforme indicado na Tabela 2.2) (Figura 3.1). Daí se conclui que os reagentes de PCR utilizados para a detecção de *Salmonella* sp. mostraram eficiência (permitem a obtenção da banda esperada) e as soluções usadas estão livres de contaminações, já que nenhuma outra amplificação inespecífica foi obtida.

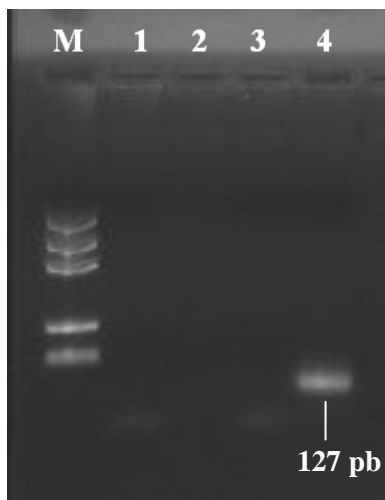
## *Escherichia coli*



**Figura 3.2:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes ao teste de pureza e eficiência dos reagentes utilizados no PCR para detecção de *Escherichia coli*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 - ECneg1 (ausência de *primer reverse*); 2 – ECneg2 (ausência de *primer forward*); 3 – ECneg3 (sem *Taq* DNA polimerase); 4 – ECpos (reação teste, com todos os reagentes).

No caso dos resultados para a detecção de *Escherichia coli* (Figura 3.2), verifica-se que houve uma ligação inespecífica do *primer forward*, gerando algumas bandas de tamanho superior ao esperado (306pb, segundo a Tabela 2.2), como se pode verificar na reação do poço 1 da Figura 3.2. No entanto, quando o par de *primers* é colocado em conjunto (*primer forward* e *primer reverse*), sem (poço 3) e com de *Taq* DNA Polimerase (poço 4 da Figura 3.2), é originada apenas uma banda com o tamanho esperado (306pb), que é facilmente distinguível das bandas inespecíficas visíveis no poço 1, pelo que, mesmo que aparecessem em simultâneo numa reação, seria possível distinguir entre as bandas (uma vez que possuem tamanhos e intensidades diferentes). Ou seja, a banda que surge no poço 4, e que permite a identificação de *E. coli*, parece concorrer com as bandas inespecíficas do poço 1, pois no poço 4 as mesmas não surgem.

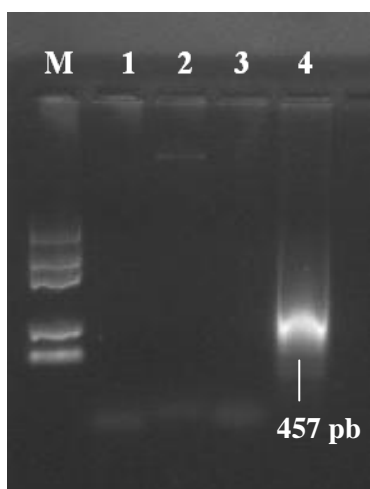
### *Staphylococcus aureus*



**Figura 3.3:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes ao teste de pureza e eficiência dos reagentes utilizados no PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 - SAneg1 (ausência de *primer reverse*); 2 – SAneg2 (ausência de *primer forward*); 3 – SAneg3 (sem *Taq* DNA polimerase); 4 – SApos (reação teste, com todos os reagentes).

No caso de *Staphylococcus aureus*, apenas no poço 4 se obteve amplificação, e no tamanho esperado (127pb, segundo a Tabela 2.2) (Figura 3.3). Daí se pode concluir que os reagentes de PCR utilizados para *Staphylococcus aureus* apresentam pureza e eficiência adequada para uma correta identificação do microrganismo em estudo.

### *Listeria monocytogenes*



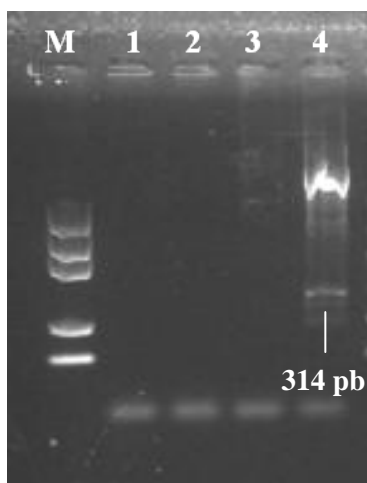
**Figura 3.4:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes ao teste de pureza e eficiência dos reagentes utilizados no PCR para a detecção de *Listeria monocytogenes*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 - LTneg1 (ausência de *primer reverse*); 2 – LTneg2 (ausência de *primer forward*); 3 – LTneg3 (sem *Taq* DNA polimerase); 4 – LTpos (reação teste, com todos os reagentes).

Por fim, para a detecção de *Listeria monocytogenes*, mais uma vez apenas no poço 4 foi observável uma banda visível no tamanho esperado (457pb, conforme indicado na Tabela 2.2) (Figura 3.4), o que indica que os reagentes utilizados se encontram viáveis, sem contaminações e originam o resultado esperado.

### 3.2.3. Especificidade dos *primers* usados

No teste à especificidade dos *primers* (exemplificado na Tabela 2.5) é de esperar que cada par de *primers* desenhado para um organismo em particular, não origine amplificação senão para o microrganismo em questão. Ou seja, os *primers* desenhados para a identificação de *Salmonella* sp. devem originar amplificação apenas quando é usado como molde o ADN de *Salmonella* sp.

#### *Salmonella* sp.

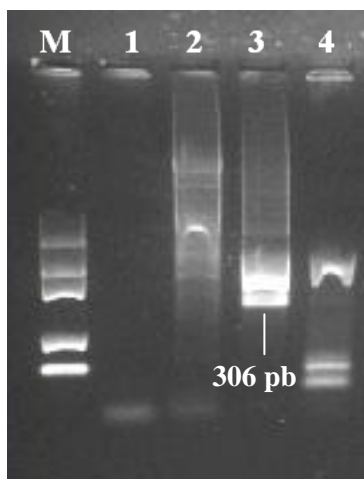


**Figura 3.5:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da especificidade dos *primers* usados na detecção de *Salmonella* sp., em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – ADN molde: *S. aureus*; 2 – ADN molde: *L. monocytogenes*; 3 – ADN molde: *E. coli*; 4 – ADN molde: *Salmonella* sp.

Para *Salmonella* sp. apenas se obteve amplificação na reação em que o ADN molde usado foi precisamente o de *Salmonella* sp. (poço 4, Figura 3.5), sendo a banda gerada a esperada (313pb, conforme a Tabela 2.2) Ou seja, os *primers* mostraram especificidade. Embora seja visível uma banda de tamanho mais elevado, esta corresponde a ADN genómico de *Salmonella* sp.

Com este resultado, é possível afirmar que os *primers* usados são específicos para *Salmonella* sp., não originando amplificação com o ADN dos outros microrganismos.

### *Escherichia coli*

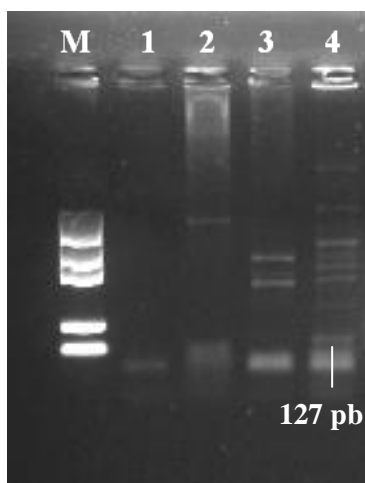


**Figura 3.6:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da especificidade dos *primers* usados na detecção de *E. coli*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – ADN molde: *S. aureus*; 2 – ADN molde: *L. monocytogenes*; 3 – ADN molde: *E. coli*; 4 – ADN molde: *Salmonella* sp.

A especificidade dos *primers* para detecção de *E. coli* foi igualmente testada, onde, no poço 3 (Figura 3.6) é visível uma banda com o tamanho esperado (306pb, segundo a Tabela 2.2). Apesar de serem visíveis outras bandas com tamanhos diferentes, que se devem a ligações inespecíficas, a banda esperada é facilmente distinguível.

Nos poços 2 e 4 (Figura 3.6), onde está presente o ADN molde de *L. monocytogenes* e de *Salmonella* sp., respetivamente, também é possível visualizar diversas amplificações, o que indica que os *primers* usados desenhados para *E. coli* não são totalmente específicos, gerando um resultado positivo noutros organismos. Ainda assim, deve ser referido que ao tamanho esperado, 306pb, apenas na situação em que se usa como ADN molde o ADN de *E. coli*, é obtida amplificação.

### *Staphylococcus aureus*

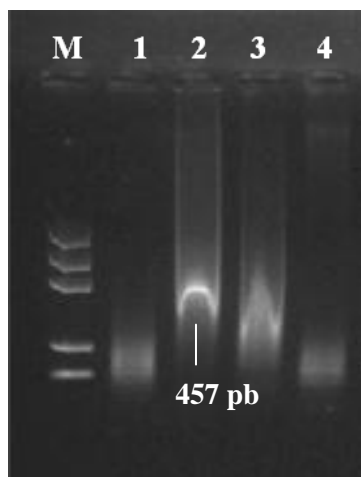


**Figura 3.7:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da especificidade dos *primers* usados na detecção de *S. aureus*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – ADN molde: *Salmonella* sp.; 2 – ADN molde: *L. monocytogenes*; 3 – ADN molde: *E. coli*; 4 – ADN molde: *S. aureus*.

Relativamente aos resultados para o estudo da especificidade dos *primers* desenhados para o ADN de *S. aureus*, são visíveis, no poço 4 (Figura 3.7), várias bandas inespecíficas. No entanto, a banda que seria de esperar (127pb, conforme a Tabela 2.2) também é visualizada.

Na verdade, os *primers* desenhados para *S. aureus* apresentam um elevado grau de inespecificidade, mostrando apenas ausência de reação quando ADN molde de *Salmonella* sp. é usado. Estes *primers*, embora deem origem a uma banda do tamanho esperado, numa situação em que estivesse presente ADN de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* não permitiriam a distinção entre os microrganismos em questão, sendo portanto pouco elucidativos. Poderiam no entanto ser úteis numa situação em que a contaminação de um alimento com qualquer um destes microrganismos fosse determinante na não comercialização do produto (numa única reação daria um resultado positivo qualquer um dos três microrganismos que estivesse presente).

### *Listeria monocytogenes*



**Figura 3.8:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da especificidade dos *primers* usados na detecção de *Listeria monocytogenes*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – ADN molde: *S. aureus*; 2 – ADN molde: *L. monocytogenes*; 3 – ADN molde: *E. coli*; 4 – ADN molde: *Salmonella* sp.

Por fim, para *L. monocytogenes* a banda esperada é visível no poço 2 (457pb, conforme a Tabela 2.2), onde seria de esperar (Figura 3.8).

No entanto, a qualidade da imagem não é a melhor e a sua repetição deverá constar nos procedimentos a repetir. Em todos os poços é visível um arrastamento de possíveis amplificações, dificultando a análise. Este arrastamento não é no entanto observado no marcador de pesos moleculares, o que nos leva a crer que talvez algum reagente presente nas reações de PCR possa ter gerado este aspeto distorcido das bandas.

Se a imagem fosse nítida, mas o resultado semelhante, talvez pudéssemos dizer que os *primers* parecem apresentar elevada inespecificidade, sendo que apesar disso as amplificações conseguem ser distinguíveis, ou seja possíveis de diferenciar.

#### **3.2.4. Sensibilidade dos *primers* para diferentes concentrações de ADN dos diferentes microrganismos**

Como exemplificado na Tabela 2.6, foram testadas seis concentrações de ADN, das diferentes bactérias, por forma a testar a sensibilidade do PCR ao ADN dos microrganismos a detetar. Ou seja, pretendia-se saber qual a concentração mínima de ADN que cada *primer* seria capaz de detetar.

### Determinação da concentração do ADN dos microrganismos por espectrofotometria:

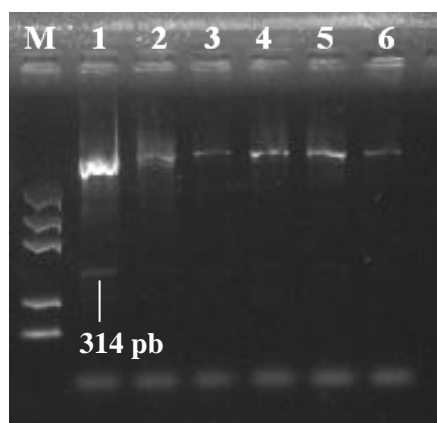
A concentração de ADN obtida, após quantificação por espectrofotometria, para as diferentes bactérias nas diferentes concentrações encontra-se na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2:** Valores de concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) de ADN dos diferentes microrganismos nas diferentes concentrações: C, C/5, C/10, C/15, C/20, C/25.

Organismo	C ( $\mu\text{g/ml}$ )	C/5 ( $\mu\text{g/ml}$ )	C/10 ( $\mu\text{g/ml}$ )	C/15 ( $\mu\text{g/ml}$ )	C/20 ( $\mu\text{g/ml}$ )	C/25 ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Salmonella</i> sp.	2	0,4	0,2	0,18	0,1	0,08
<i>E. coli</i>	7	1,4	0,7	0,55	0,35	0,28
<i>S. aureus</i>	17	3,4	1,7	1,2	0,85	0,68
<i>L. monocytogenes</i>	36	7,2	3,6	2,3	1,8	1,44

Nota: A leitura no espectrofotómetro foi realizada três vezes, e o valor usados nos cálculos foi a média dos mesmos.

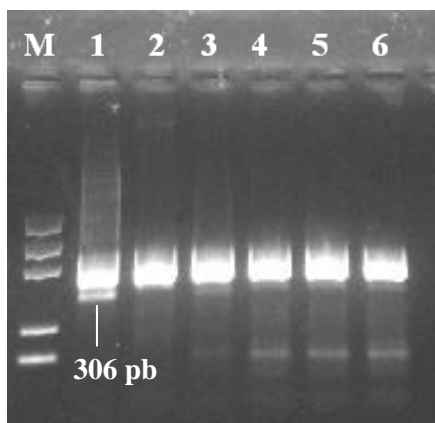
### *Salmonella* sp.



**Figura 3.9:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da sensibilidade dos *primers* a diferentes concentrações de ADN de *Salmonella* sp., em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – [ADN]: C; 2 – [ADN]: C/5; 3 – [ADN]: C/10; 4 – [ADN]: C/15; 5 – [ADN]: C/20; 6 – [ADN]: C/25.

Relativamente à sensibilidade dos *primers* desenhados para *Salmonella* sp., apenas no poço 1 (Figura 3.9) é visível a banda correspondente aos 314pb. Nos restantes poços/concentrações não se verificou qualquer amplificação. Com este resultado podemos dizer que para os *primers* desenhados para a deteção de *Salmonella* sp. a concentração mínima de ADN que é possível detetar é 2  $\mu\text{g/ml}$ .

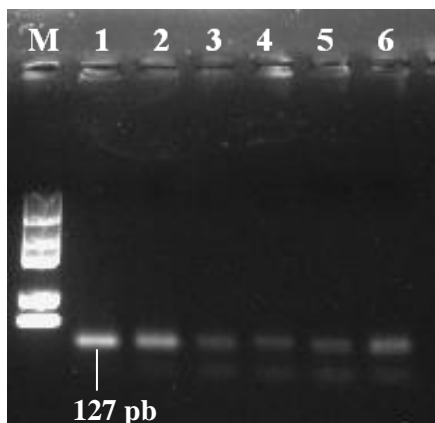
### *Escherichia coli*



**Figura 3.10:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da sensibilidade dos *primers* a diferentes concentrações de ADN de *Escherichia coli*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – [ADN]: C; 2 – [ADN]: C/5; 3 – [ADN]: C/10; 4 – [ADN]: C/15; 5 – [ADN]: C/20; 6 – [ADN]: C/25.

Relativamente aos resultados para *E. coli*, verifica-se que são visualizadas bandas, com o tamanho esperado, em todos os poços (Figura 3.10). É portanto possível afirmar que este método permite a deteção de *E. coli* até 0,28 µg/ml, podendo até mesmo detetar níveis inferiores, que não foram testados.

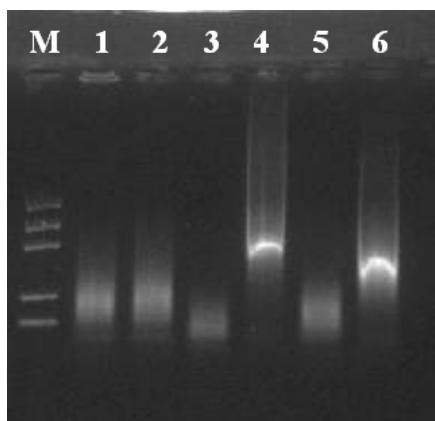
### *Staphylococcus aureus*



**Figura 3.11:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da sensibilidade dos *primers* a diferentes concentrações de ADN de *Staphylococcus aureus*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – [ADN]: C; 2 – [ADN]: C/5; 3 – [ADN]: C/10; 4 – [ADN]: C/15; 5 – [ADN]: C/20; 6 – [ADN]: C/25.

No caso de *S. aureus*, verifica-se que este método molecular é capaz de detetar todas as concentrações testadas, sendo que para concentrações mais elevadas (poço 1 e 2) (Figura 3.11), a banda é mais evidente. No entanto mesmo para a concentração mais baixa (0,68 µg/ml) este método consegue detetar a bactéria.

## *Listeria monocytogenes*



**Figura 3.12:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da sensibilidade dos *primers* a diferentes concentrações de ADN de *Listeria monocytogenes*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; 1 – [ADN]: C; 2 – [ADN]: C/5; 3 – [ADN]: C/10; 4 – [ADN]: C/15; 5 – [ADN]: C/20; 6 – [ADN]: C/25.

Por fim, para *L. monocytogenes* os resultados foram totalmente inconclusivos. Mais uma vez, quando se usa ADN de *L. monocytogenes* como molde, o resultado do gel de agarose tem arrastamentos e bandas distorcidas. Este resultado vem dar mais força à ideia defendida anteriormente de que é provável a existência de inibidores na solução de ADN purificada a partir de *L. monocytogenes*. O suposto interferente afeta não só a corrida em gel de agarose mas igualmente a amplificação por PCR.

### 3.2.5. Extração de ADN de framboesas e alface com recurso a um kit comercial

Concentração do ADN das amostras:

**Tabela 3.3:** Valores de concentração final ( $\mu\text{g/ml}$ ) de ADN de framboesas e alface extraído com um kit comercial.

	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Framboesas</b>	30
<b>Alface</b>	27

Nota: A leitura no espectrofotómetro foi realizada três vezes, e o valor usados nos cálculos foi a média dos mesmos.

Conclui-se através dos resultados da Tabela 3.3 que o rendimento da extração de ADN foi superior para framboesas, mas a diferença foi reduzida. Em ambos os casos, o kit usado permitiu extrair o ADN de forma eficiente.

### 3.2.6. Sensibilidade do método de detecção usado, variando a concentração “adicionada” de microrganismos

Após a realização do procedimento demonstrado pela Figura 2.2, são aqui apresentados os resultados referentes ao teste da preparação das amostras usado (rebetamento das células através de fervura), variando a concentração de células de microrganismos “adicionadas” (células presentes na amostra).

Começamos por determinar qual o número de células/ml (UFC), que estava presente no crescimento, feito *overnight*, e a partir do qual se fez a “adição” à amostra inicial (esta determinação foi realizada através de contagens em placa) (Tabela 3.4).

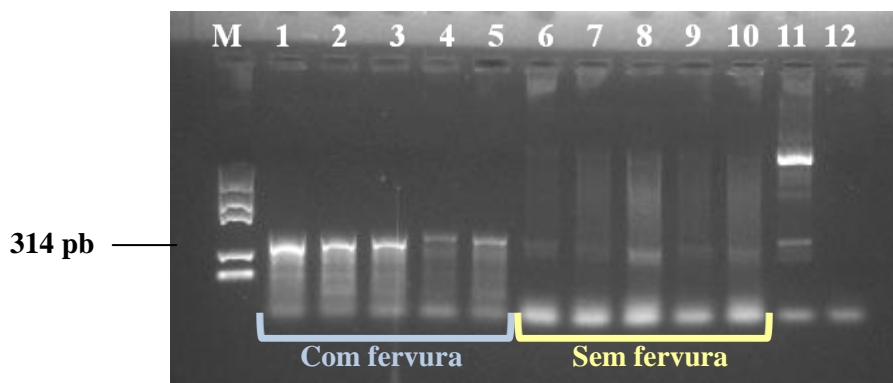
#### Número de células/ml e número de células “adicionadas” nos diferentes volumes

**Tabela 3.4:** Resultados do número de células por ml (UFC) e número de células “adicionadas” em cada um dos volumes (50, 100, 150 e 200µl) para cada uma das bactérias.

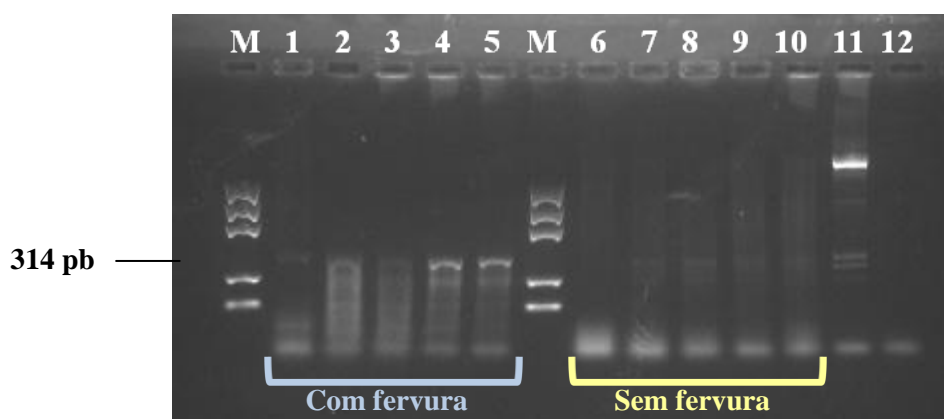
Microrganismos	UFC's (nº células/ml)	Nº de células adicionadas (UFC)			
		50 (µl)	100 (µl)	150 (µl)	200 (µl)
<i>Salmonella sp.</i>	$2 \times 10^9$	$1 \times 10^8$	$2 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$4 \times 10^8$
<i>E. coli</i>	$1,8 \times 10^9$	$9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$
<i>S. aureus</i>	$3,6 \times 10^8$	$1,8 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$	$7,2 \times 10^6$
<i>L. monocytogenes</i>	$2,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$

Por forma a avaliar qual dos dois métodos de preparação da amostra era mais eficiente, a amostras de framboesas e alface foram adicionados volumes crescentes de um crescimento *overnight* de cada uma das bactérias em estudo.

*Salmonella* sp.



**Figura 3.13:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de framboesas, variando a concentração “adicionada” de *Salmonella* sp., em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl; sem fervura das amostras: 6 – sem inoculo; 7 – 50µl; 8 – 100µl; 9 – 150µl; 10 – 200µl. 11 – Controle positivo; 12 – Controle negativo.



**Figura 3.14:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de alfaca, variando a concentração “adicionada” de *Salmonella* sp., em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl; sem fervura das amostras: 6 – sem inoculo; 7 – 50µl; 8 – 100µl; 9 – 150µl; 10 – 200µl. 11 – Controle positivo; 12 – Controle negativo.

Após a adição de *Salmonella* sp. a framboesas (Figura 3.13), verificou-se que efetivamente foram obtidos melhores resultados na amplificação por PCR das amostras sujeitas ao método de extração/fervura (poços 1 a 5, Figura 3.13), sendo que a amplificação obtida apresenta o tamanho esperado (314pb).

Para a amostra não inoculada com *Salmonella* sp., seria de esperar que não se observasse qualquer banda, no entanto isso não se verifica (poço 1, Figura 3.13). Poderão ser razões

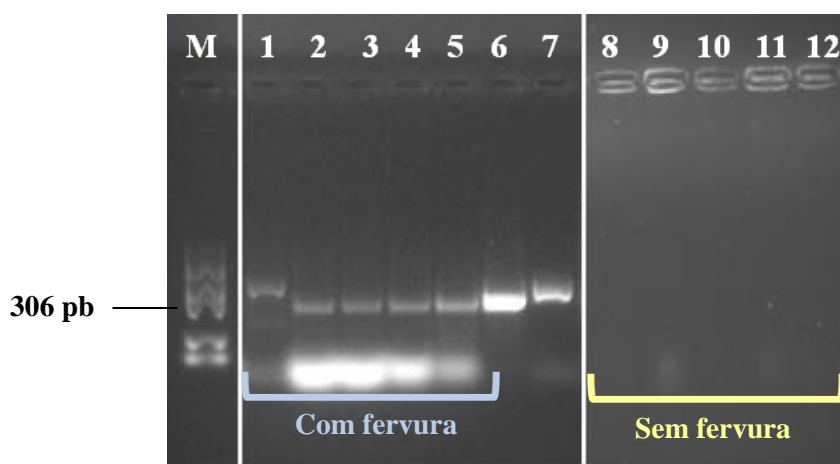
para tal, o facto de terem ocorrido contaminações cruzadas ou a amostra utilizada estar naturalmente contaminada com a bactéria em questão.

Quanto às crescentes concentrações de células, os resultados obtidos não permitem verificar este aumento de concentração, pois apesar de em todas as concentrações testadas se visualizar a banda esperada, à medida que aumentamos o número de células a banda torna-se menos nítida ao invés de se tornar mais nítida. No entanto, mesmo para o menor número de células adicionadas,  $1 \times 10^8$  células, é possível visualizar a banda esperada.

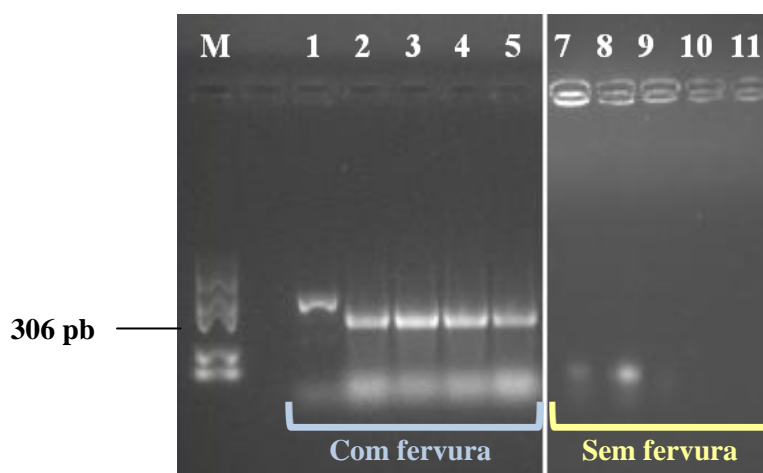
No caso da *Salmonella* sp. “adicionada” a alface, uma vez mais o método de extração baseado na fervura das amostras se mostrou mais eficaz (poços 1 a 5, Figura 3.14), observando-se bandas no valor esperado (314pb) para todas as concentrações testadas de microrganismos “adicionados”. No caso do poço 1, em que a alface não foi inoculada “artificialmente” com a bactéria em questão, observa-se uma banda pouco nítida, podendo uma vez mais ser resultado de contaminações cruzadas ou a amostra já estar contaminada naturalmente.

Quanto às diferentes concentrações testadas, observa-se, como esperado, um aumento de nitidez da amplificação nas concentrações maiores. No entanto, para todas as concentrações é possível visualizar a banda esperada, mesmo para um volume de *Salmonella* sp. de  $50 \mu\text{l}$ , que corresponde a  $1 \times 10^8$  células.

### *Escherichia coli*



**Figura 3.15:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de framboesas, variando a concentração “adicionada” de *Escherichia coli*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inóculo; 2 –  $50 \mu\text{l}$ ; 3 –  $100 \mu\text{l}$ ; 4 –  $150 \mu\text{l}$ ; 5 –  $200 \mu\text{l}$ . 6 – Controlo positivo; 7 – Controlo negativo. Sem fervura das amostras: 8 – sem inóculo; 9 –  $50 \mu\text{l}$ ; 10 –  $100 \mu\text{l}$ ; 11 –  $150 \mu\text{l}$ ; 12 –  $200 \mu\text{l}$ .



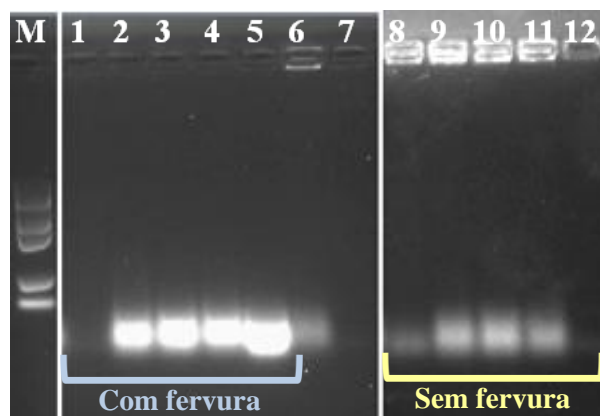
**Figura 3.16:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de alface, variando a concentração “adicionada” de *Escherichia coli*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50 $\mu$ l; 3 – 100 $\mu$ l; 4 – 150 $\mu$ l; 5 – 200 $\mu$ l. Sem fervura das amostras: 7 – sem inoculo; 8 – 50 $\mu$ l; 9 – 100 $\mu$ l; 10 – 150 $\mu$ l; 11 – 200 $\mu$ l.

Uma vêz mais, no caso da *E. coli* “adicionada” a framboesas, apenas foram obtidos resultados no método em que houve rebentamento de células por fervura (do poço 1 ao 7, Figura 3.15). No poço 1, em que não foi “adicionada” *E. coli* à amostra de framboesas, seria de esperar que não houvesse amplificação, no entanto aparece uma banda inespecífica com um tamanho ligeiramente maior que as restantes bandas, mas facilmente distinguível. Também no poço 7, onde se encontra o controlo negativo, aparece a mesma banda inespecífica, indicando assim que ocorreu alguma contaminação na reação. No entanto, a banda que aparece nas reações que têm *E.coli* (reações dos poços 2 a 6), parece concorrer com a banda inespecífica que aparece no poço 1 e 7, pois nas reações que contêm *E.coli* a banda inespecífica não surge.

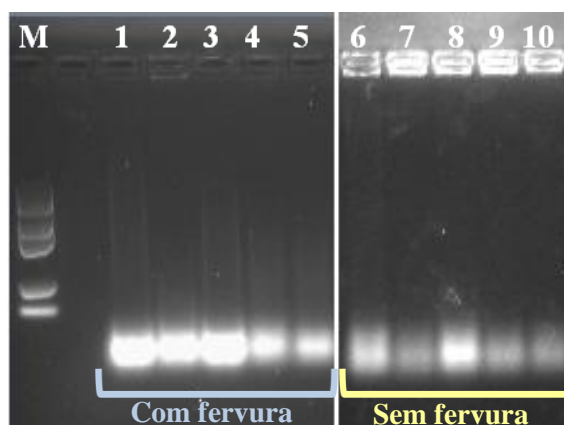
Tal como no exemplo anterior, quando *E. coli* foi adicionada a amostras de alface, o método de rebentamento de células por fervura permitiu obter melhores resultados (Figura 3.16). Uma vez mais, no poço 1, que corresponde à não adição de *E. coli* à amostra de alface, é visível uma banda inespecífica com um tamanho acima do tamanho esperado, pelo que a sua distinção da banda correta é fácil de fazer.

Quanto às diferentes concentrações testadas, tanto para framboesas (Figura 3.15) como para alface (Figura 3.16), não é visível um aumento de nitidez nas concentrações maiores. No entanto, para todas as concentrações é possível visualizar a banda esperada, mesmo para um volume de *E. coli* de 50 $\mu$ l, que corresponde a  $9 \times 10^7$  células.

### *Staphylococcus aureus*



**Figura 3.17:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de framboesas, variando a concentração “adicionada” de *Staphylococcus aureus*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50 $\mu$ l; 3 – 100 $\mu$ l; 4 – 150 $\mu$ l; 5 – 200 $\mu$ l. 6 – Controlo positivo; 7 – Controlo negativo. Sem fervura das amostras: 8 – sem inoculo; 9 – 50 $\mu$ l; 10 – 100 $\mu$ l; 11 – 150 $\mu$ l; 12 – 200 $\mu$ l.



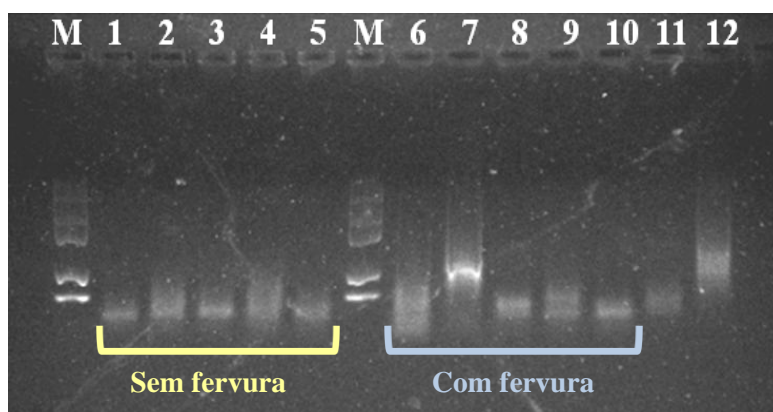
**Figura 3.18:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes á avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de alfaca, variando a concentração “adicionada” de *Staphylococcus aureus*, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50 $\mu$ l; 3 – 100 $\mu$ l; 4 – 150 $\mu$ l; 5 – 200 $\mu$ l; sem fervura das amostras: 6 – sem inoculo; 7 – 50 $\mu$ l; 8 – 100 $\mu$ l; 9 – 150 $\mu$ l; 10 – 200 $\mu$ l.

Relativamente aos resultados obtidos para as amostras de framboesas a que foram “adicionadas” células de *S. aureus* (Figura 3.17), verifica-se que não foram obtidos resultados satisfatórios em nenhum dos métodos usados, uma vez que não foi observada qualquer banda no tamanho esperado (127pb).

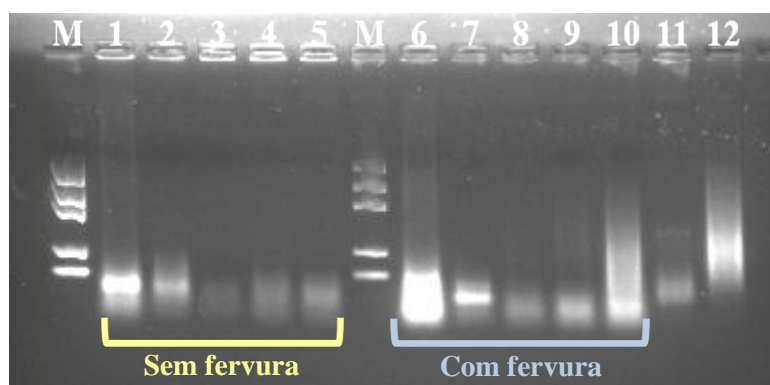
Nem mesmo no controlo positivo (poço 6, Figura 3.17) foi possível observar qualquer banda.

Também no caso de *S. aureus* “adicionada” a amostras de alface (Figura 3.18) não foram obtidos resultados satisfatórios em nenhum dos métodos, uma vez que não foi observada qualquer banda no tamanho esperado (127pb).

### *Listeria monocytogenes*



**Figura 3.19:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de framboesas, variando a concentração “adicionada” de *Listeria monocytogenes* inoculada em amostras de framboesas, em que: M – Marcador de pesos moleculares; sem fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl; com fervura das amostras: 6 – sem inoculo; 7 – 50µl; 8 – 100µl; 9 – 150µl; 10 – 200µl. 11 – Controlo positivo; 12 – Controlo negativo.



**Figura 3.20:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da eficiência do método de preparação da amostra de alface, variando a concentração “adicionada” de *Listeria monocytogenes* inoculada em amostras de framboesas, em que: M – Marcador de pesos moleculares; sem fervura das amostras: 1 – sem inoculo; 2 – 50µl; 3 – 100µl; 4 – 150µl; 5 – 200µl; com fervura das amostras: 6 – sem inoculo; 7 – 50µl; 8 – 100µl; 9 – 150µl; 10 – 200µl. 11 – Controlo positivo; 12 – Controlo negativo.

Por fim, os resultados de *L. monocytogenes* (Figura 3.19 e Figura 3.20), assim como nos de *S. aureus*, não permitem visualizar qualquer banda no tamanho esperado (457pb) nem

no caso de framboesas, nem no de alface. No entanto, no gel referente à alface (Figura 3.20) é visível no controlo positivo (poço 11) uma banda com o tamanho esperado (457pb), apesar de pouco nítida, o que poderá indicar que o método de preparação da amostra baseado na fervura não foi eficaz.

Tal como no caso anterior (para *S. aureus*) em que se obteve resultados negativos, apenas podemos supor a presença de inibidores que tenham impedido a amplificação do fragmento de ADN em estudo ou, por outro lado, o método de preparação da amostra não é indicado para estas bactérias.

**Tabela 3.5:** Resumo dos resultados obtidos (positivos ou negativos) para a eficiência dos métodos de preparação da amostra usados.

<b>Organismo</b>	<b>Método</b>	<b>Framboesas</b>	<b>Alface</b>
<i>Salmonella sp.</i>	Com fervura	+	+
	Sem fervura	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Com fervura	+	+
	Sem fervura	-	-
<i>Staplylococcus aureus</i>	Com fervura	-	-
	Sem fervura	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	Com fervura	-	-
	Sem fervura	-	-

**Legenda:** + : Resultados positivos; - : Resultados negativos

De forma geral, para *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*, tanto para framboesas como para alface, o método de preparação da amostra mais eficiente é o método baseado na fervura (Tabela 3.5). Já para as bactérias *Staplylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* nenhum dos métodos foi eficiente (Tabela 3.5).

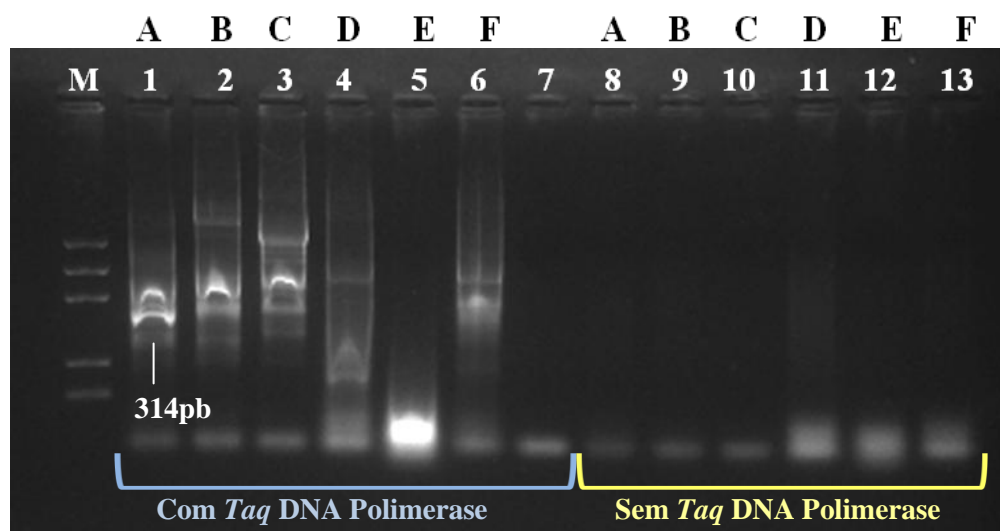
Ainda assim, apesar de nenhum dos métodos de preparação da amostra funcionar para as bactérias Gram-positivas em estudo, para a análise de amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português, a pesquisa destas bactérias foi também realizada, utilizando o método baseado na fervura. Foi portanto abandonado o método sem fervura, e para a pesquisa das bactérias em amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português foi apenas realizado o método de preparação da amostra baseado na fervura.

### 3.3. Análise de amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português

Neste ponto são apresentados e analisados os resultados obtidos da análise quanto à presença das bactérias patogênicas em estudo em amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português. As amostras encontram-se codificadas com as letras A, B, C, D, E e F, como demonstrado na Tabela 2.7 e o procedimento que foi realizado está esquematizado na Figura 2.3.

A análise foi realizada com e sem *Taq* DNA polimerase para todas as amostras e bactérias em estudo, no entanto, para as reações sem enzima, não era visível qualquer amplificação, servindo apenas de controlo. Como tal, apenas serão apresentados os resultados sem *Taq* DNA polimerase para a *Salmonella* sp., servindo estes resultados de exemplo para as restantes bactérias estudadas.

#### *Salmonella* sp.



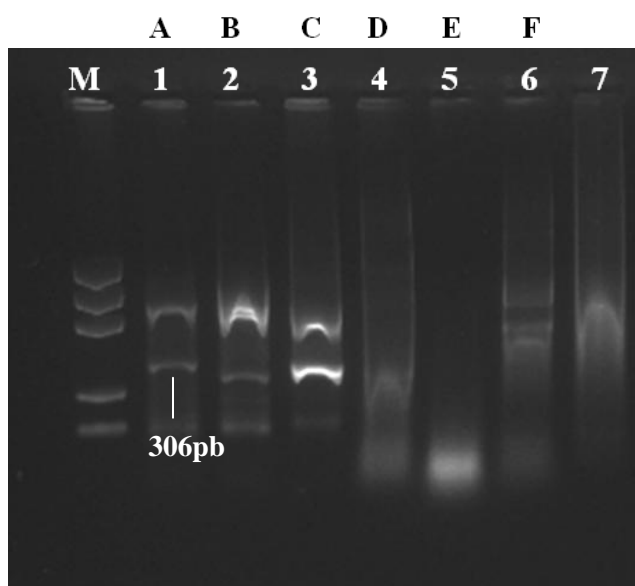
**Figura 3.21:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da análise quanto à presença de *Salmonella* sp. em amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com *Taq* DNA polimerase: 1 – amostra A; 2 – amostra B; 3 – amostra C; 4 – amostra D; 5 – amostra E; 6 – amostra F; 7 – Controlo negativo; sem *Taq* DNA polimerase: 8 – amostra A; 9 – amostra B; 10 – amostra C; 11 – amostra D; 12 – amostra E; 13 – amostra F.

Na pesquisa de *Salmonella* sp. em framboesas à venda no mercado português, verificou-se que o controlo negativo (apenas reagentes, sem adição de amostra), presente no poço 7 da Figura 3.21, apresentou o resultado esperado, ou seja, não houve qualquer amplificação, garantindo assim a pureza dos reagentes utilizados. Quanto à análise de amostras à venda

no mercado português, é possível afirmar que as amostras A, B e C, apresentadas nos poços 1, 2 e 3 (Figura 3.21), respetivamente, nitidamente apresentam amplificação no tamanho esperado (314pb). As amostras D e F, apresentadas nos poços 4 e 6 (Figura 3.21) apresentam algum arrastamento o que pode significar que algum interferente poderia estar presente aquando da preparação da amostra.

Relativamente à amostra E, não se observa qualquer amplificação, o que significa que a amostra não está contaminada com *Salmonella* sp.

### *Escherichia coli*

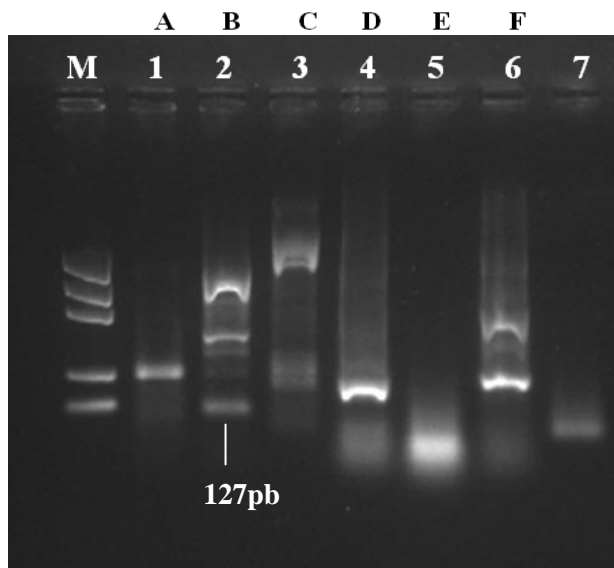


**Figura 3.22:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da análise quanto à presença de *Escherichia coli* em amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com *Taq* DNA polimerase: 1 – amostra A; 2 – amostra B; 3 – amostra C; 4 – amostra D; 5 – amostra E; 6 – amostra F; 7 – Controlo negativo.

Quanto à pesquisa de *E. coli*, os resultados mostram que nas amostras A, B e C (poços 1, 2 e 3 da Figura 3.22) existe amplificação nítida. Nas amostras D e F (poços 4 e 6) a amplificação que ocorreu não parece gerar uma banda com o tamanho esperado (306pb), pelo que à partida significará que as amostras não estarão contaminadas, mas ainda assim serão amostras que deverão ser reavaliadas.

Quanto à amostra E (poço 5), não é visível qualquer banda, o que leva a crer que nesta amostra não há contaminação por *E. coli*.

### *Staphylococcus aureus*



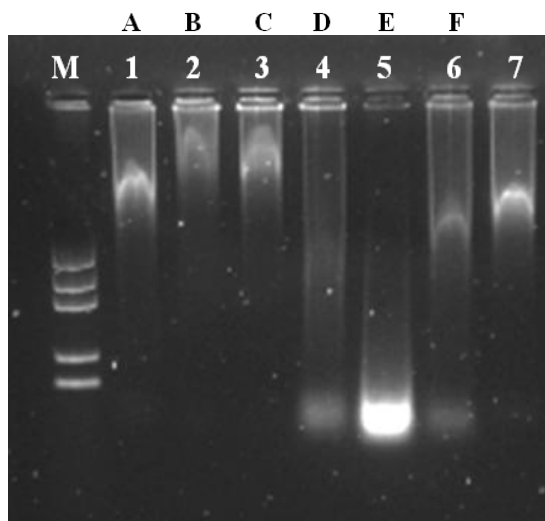
**Figura 3.23:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da análise quanto à presença de *Staphylococcus aureus* em amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com *Taq* DNA polimerase: 1 – amostra A; 2 – amostra B; 3 – amostra C; 4 – amostra D; 5 – amostra E; 6 – amostra F; 7 – Controlo negativo.

No que diz respeito à presença de *S. aureus* em framboesas e alface, os resultados mostraram que apenas a amostra B (poços 2, Figura 3.23) apresenta uma contaminação, já que é visível o aparecimento de uma banda de 127 pb.

Nas restantes amostras há alguns casos (A, C, D e F) amplificações, mas que não correspondem ao tamanho esperado. Na verdade, para as amostras D e F há amplificações com tamanhos muito próximos ao esperado, pelo que pensamos ser importante repetir as análises feitas.

Quanto à amostra E (poço 5), não é visível qualquer banda, o que leva a crer que nesta amostra não há contaminação por *S. aureus*.

## *Listeria monocytogenes*



**Figura 3.24:** Eletroforese em gel de agarose (2%) das reações de PCR, referentes à avaliação da análise quanto à presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de framboesas e alface vendidas no mercado português, em que: M – Marcador de pesos moleculares; com *Taq* DNA polimerase: 1 – amostra A; 2 – amostra B; 3 – amostra C; 4 – amostra D; 5 – amostra E; 6 – amostra F; 7 – Controlo negativo.

A pesquisa de *L. monocytogenes* mostrou-se infrutífera, já que nenhuma das amostras de framboesa e alface analisadas mostraram possuir contaminação por esta bactéria. A banda esperada teria 457pb, pelo que é claro na Figura 3.24 a sua ausência em todas as amostras.

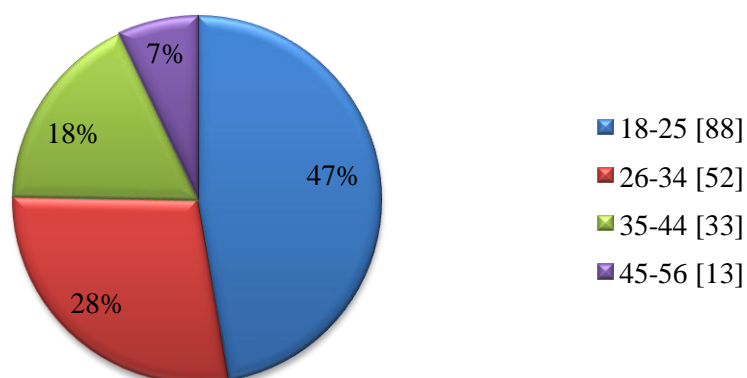
### 3.4. Análise descritiva dos resultados do questionário

A amostra é constituída por um total de 186 inquiridos, obtidos de modo totalmente aleatório. Os resultados obtidos a cada questão colocada no questionário encontram-se representados nas figuras seguintes.

Iniciando a descrição dos dados em estudo, observa-se que relativamente ao grupo etário (Figura 3.25), a amostra é maioritariamente constituída por indivíduos com idades entre 18 anos e 25 anos (47%), seguindo-se o grupo etário dos 26 aos 34 anos (28%), 35 aos 44 anos (18%) e, por fim, o grupo etário com idades entre 45 e 56 anos (7%).

Quanto à distribuição da amostra por género (Anexo II), constatou-se que esta é composta por 77% de inquiridos do sexo feminino e 23% do sexo masculino.

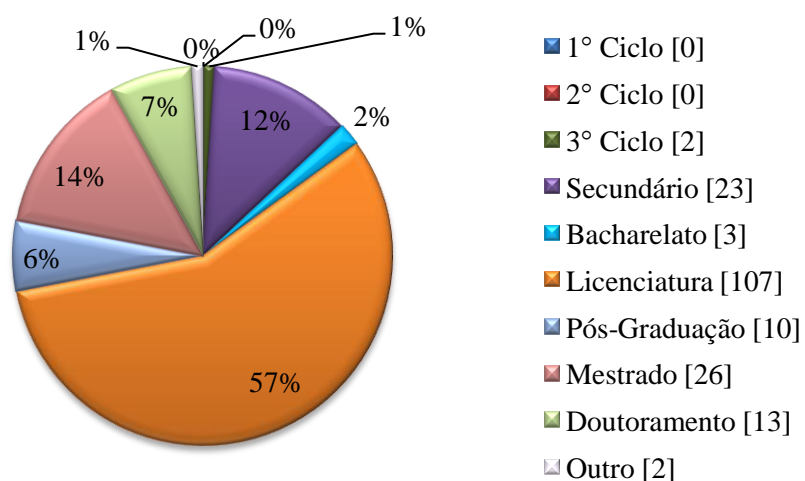
### Q1. Idade



**Figura 3.25:** Distribuição da amostra por faixa etária.

No que diz respeito ao grau de escolaridade (Figura 3.26), verificou-se que a maioria dos inquiridos (57%) é detentor de licenciatura, seguindo-se mestrado (14%), secundário (12%), doutoramento (7%) e pós-graduação (6%). Com uma expressão notoriamente mais reduzida vêm os inquiridos com bacharelato (2%), 3º ciclo (1%) e outro (1%). Nenhum dos inquiridos apresenta um grau de escolaridade ao nível do 1º e 2º ciclo. Relativamente aos 2 inquiridos que responderam outro grau de escolaridade, um deles menciona estar a frequentar a licenciatura e o outro não especifica o grau de escolaridade que possui.

### Q3. Habilitações Literárias

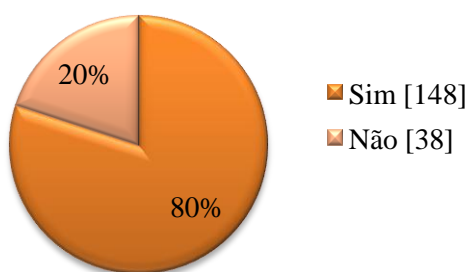


**Figura 3.26:** Distribuição da amostra por grau de escolaridade.

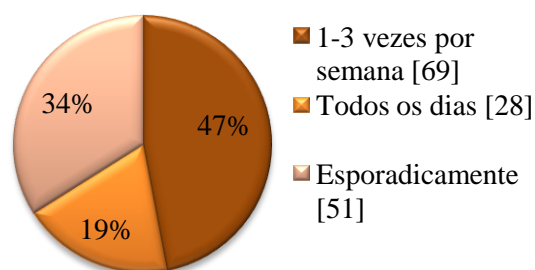
Quando os inquiridos foram questionados sobre o consumo de produtos hortofrutícolas minimamente processados (Figura 3.28), do total dos inquiridos (186), 148 responderam que consomem (80%) e 38 responderam que não consomem (20%).

Relativamente à frequência com que os inquiridos, que responderam sim na questão anterior, consomem produtos hortofrutícolas minimamente processados (Figura 3.27), observou-se que a maioria consome 1-3 vezes por semana (47%), seguindo-se a frequência esporádica (34%) e por fim a frequência diária (19%).

**Q4. Consome produtos hortofrutícolas minimamente processados?**



**Q5. Com que frequência consome produtos frescos minimamente processados?**



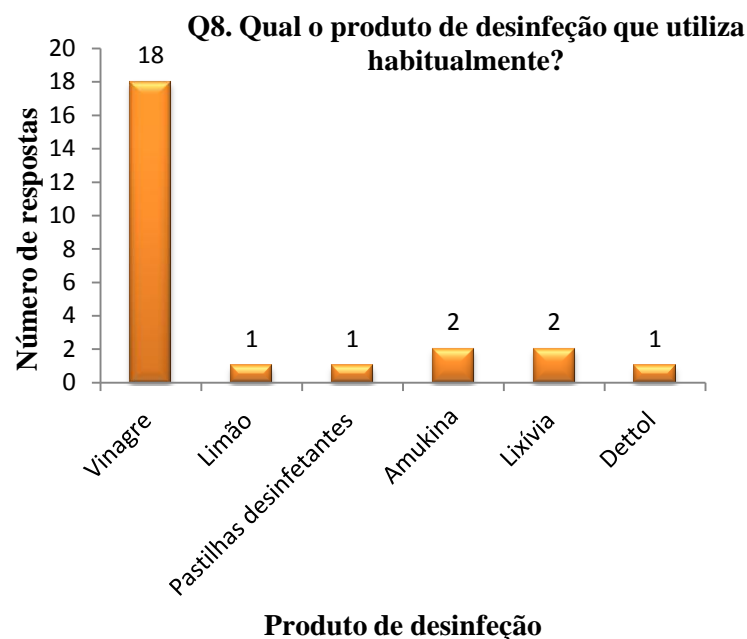
**Figura 3.28:** Consumo de hortofrutícola minimamente processados pelos inquiridos.

**Figura 3.27:** Frequência com que os inquiridos consomem produtos frescos minimamente processados.

Quanto ao hábito de lavar com água os produtos frescos minimamente processados (Anexo II), do total de inquiridos que consome este tipo de produtos (148 inquiridos), 117 responderam que sim (79%), que têm o hábito de lavar com água este tipo de produtos, e 31 responderam que não (21%).

Do total de inquiridos que habitualmente lava com água os produtos frescos minimamente processados (117 inquiridos), 96 respondem que não costumam utilizar algum produto para desinfeção dos mesmos (82%) e os restantes 21 respondem que sim (18%), que têm o hábito de utilizar algum produto para desinfeção para além da água (Anexo II).

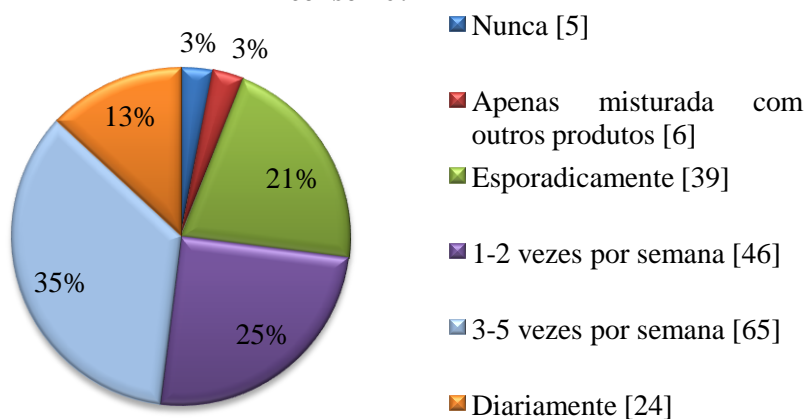
Relativamente ao produto de desinfeção utilizado habitualmente pelos inquiridos (Figura 3.29), o vinagre foi o eleito, com 18 respostas, 2 respostas para Amukina e lixívia e uma resposta para limão, pastilhas desinfectantes e Dettol.



**Figura 3.29:** Produto de desinfecção habitualmente utilizado pelos inquiridos.

Na questão relativa ao consumo de alface pelos inquiridos (Figura 3.30), do total de inquiridos que responderam a esta questão (185 inquiridos), 65 afirmam consumir alface 3-5 vezes por semana (35%), seguindo-se a frequência de 1-2 vezes por semana com um total de 46 inquiridos (25%), próximo dos 39 inquiridos que responderam esporadicamente (21%). Relativamente às restantes frequências, apenas 24 inquiridos afirmam consumir alface diariamente (13%), seguindo-se 6 inquiridos que alegam consumir alface apenas misturada com outros produtos (3%) e 5 inquiridos que afirmam nunca consumir alface (3%).

**Q9. Relativamente ao vegetal alface, com que frequência o consome?**

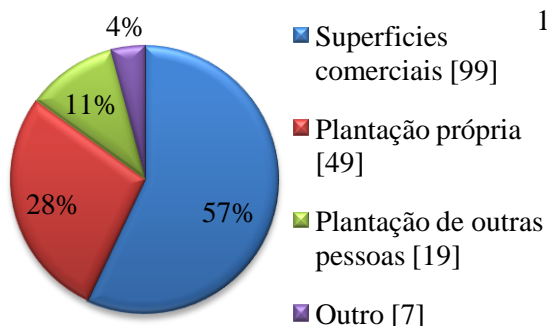


**Figura 3.30:** Frequência com que os inquiridos consomem alface.

Dos inquiridos que responderam afirmativamente ao consumo de alface na questão anterior (exceto os que a consomem apenas misturada com outros produtos), ou seja, dos 174 inquiridos, 99 afirmam que adquirem a alface nas superfícies comerciais (57%), seguindo-se os 49 que a adquirem em plantações próprias (28%), 19 em plantações de outras pessoas (11%) e por fim 7 pessoas que adquirem a alface de outra forma (4%) (Figura 3.32). Relativamente aos inquiridos que adquirem a alface de outra forma, 3 inquiridos adquirem-na no mercado, 1 na praça da fruta nas Caldas da Rainha, 1 na venda ambulante e 1 em restaurantes.

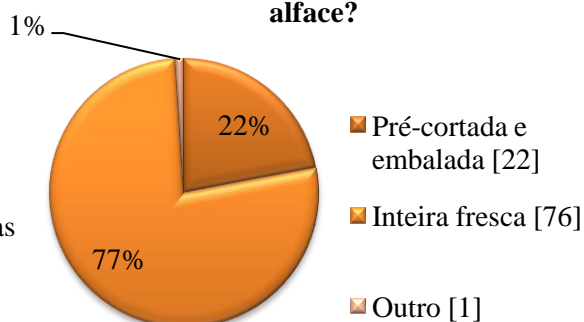
Dos inquiridos que afirmaram adquirir a alface em superfícies comerciais (99 inquiridos), 76 inquiridos indicam que compram a alface inteira fresca (77%), 22 adquirem-na pré-cortada e embalada (22%) e 1 adquire-a de outra forma (1%), alegando que compra a alface de ambas as formas mas habitualmente inteira fresca (Figura 3.31).

**Q10. Na maioria das vezes, onde costuma adquirir a alface?**



**Figura 3.32:** Local de aquisição da alface.

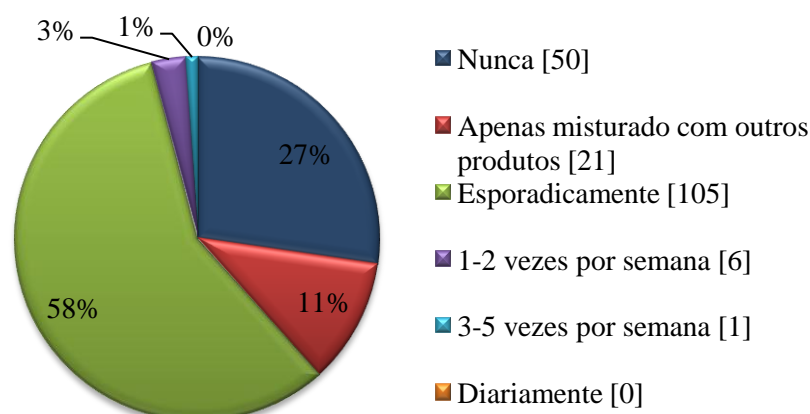
**Q11. Se na questão anterior respondeu "Superfícies comerciais", de que forma adquire normalmente a alface?**



**Figura 3.31:** Forma de aquisição da alface.

No que diz respeito ao consumo de framboesas pelos inquiridos (Figura 3.33), das 183 respostas obtidas a esta questão, 105 inquiridos afirmam que consomem framboesas esporadicamente (58%), seguindo-se 50 inquiridos que responderam que nunca consomem (27%), 21 que consomem apenas misturado com outros produtos (11%), 6 consomem 1-2 vezes por semana (3%), 1 consome 3-5 vezes por semana (1%) e nenhum inquirido afirmou consumir framboesas diariamente.

**Q12. Relativamente à fruta framboesa, como classifica o seu consumo?**

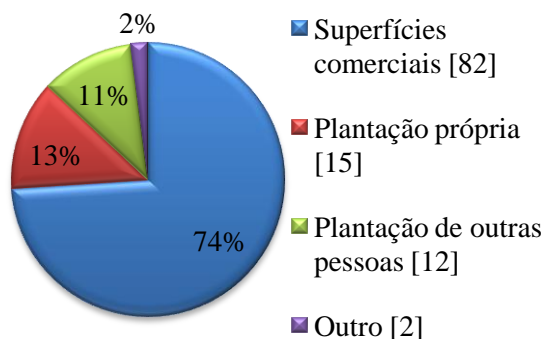


**Figura 3.33:** Frequência com que os inquiridos consomem framboesas.

Dos inquiridos que responderam afirmativamente ao consumo de framboesas na questão anterior (exceto os que a consomem apenas misturada com outros produtos), ou seja, dos 112 inquiridos, 82 afirmam adquirir as framboesas em superfícies comerciais (74%), 15 em plantações próprias (13%), 12 em plantações de outras pessoas (11%), 2 afirmam adquirir de outra forma (2%) e 1 inquirido não respondeu a esta questão (Figura 3.34). Dos 2 inquiridos que alegam adquirir as framboesas de outra forma, 1 resposta foi mercado e a outra produtor regional.

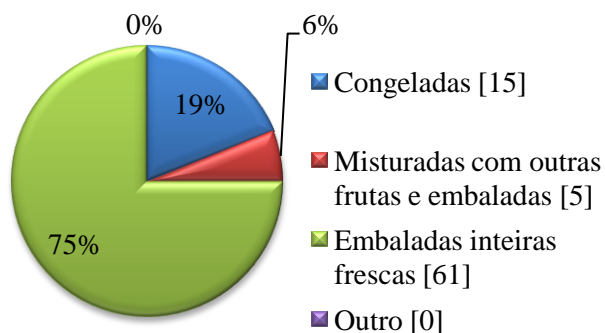
Dos inquiridos que afirmaram obter as framboesas em superfícies comerciais (82 inquiridos), 61 afirmam que as compram embaladas inteiras frescas (75%), 15 congeladas (19%), e por fim 5 adquirem-nas misturadas com outras frutas e embaladas (6%) (Figura 3.35).

**Q13. Na maioria das vezes, onde costuma adquirir as framboesas?**



**Figura 3.34:** Local de aquisição das framboesas.

**Q14. Se na questão anterior respondeu "Superfícies comerciais", de que forma adquire normalmente as framboesas?**



**Figura 3.35:** Forma de aquisição das framboesas.

#### 4. Conclusão

Frutas e vegetais são dos grupos de alimentos que mais benefícios trazem à saúde, levando à diminuição do aparecimento de certas doenças, como o cancro e doenças cardiovasculares. Dessa forma, é importante que o seu consumo continue a aumentar. Em contrapartida, por serem produtos que muitas vezes são consumidos crus, sem que haja qualquer tratamento capaz de eliminar ou reduzir para níveis aceitáveis a possível presença de microrganismos patogénicos, este grupo alimentar está associado a doenças de origem alimentar. Por este motivo, torna-se urgente e pertinente desenvolver um método eficiente de deteção de microrganismos neste tipo de produtos, para que a Indústria Alimentar possa obter resultados em tempo útil, minimizando assim o risco de infeção ao consumidor.

Para além disso, a legislação obriga a que a indústria/produtores façam um controlo microbiológico dos alimentos que produzem. Segundo a alínea a), do ponto 3, do artigo 4.º, do capítulo II, do Regulamento (CE) nº852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, os operadores das empresas do sector alimentar, devem respeitar os critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.

Ao longo do tempo, vários métodos foram desenvolvidos por laboratórios para deteção de microrganismos em alimentos. Primeiro os métodos convencionais, depois os métodos rápidos.

Os métodos convencionais apesar de serem fiáveis, são bastante demorados e trabalhosos, dificultando a adoção de medidas emergentes, pela Indústria Alimentar, quando necessário. Para além disso, são necessários muitos reagentes e vidraria, principalmente no processamento de um grande número de amostras, como as que são exigidas na Indústria Alimentar.

Este motivo levou à procura de novas metodologias mais rápidas e mais sensíveis, onde se incluem metodologias moleculares como a **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**.

A amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos utilizando a técnica de PCR, tornou-se, desde a sua descoberta, na década de 1980, uma poderosa ferramenta de diagnóstico para a análise de infeções microbianas, assim como para a análise de microrganismos em amostras de alimentos. No entanto, apesar das inúmeras vantagens que esta técnica oferece, este método, a nível tecnológico, apresenta um elevado custo de investimento na sua implementação, sendo que a falta de protocolos padrão e regulamentações *standards*

aprovadas, bem como a qualidade variável de reagentes e equipamentos que influenciam a eficiência da metodologia, leva a que os laboratórios fiquem hesitantes quanto à sua utilização. Além disso, a Indústria Alimentar, compreensivelmente, exige e espera que sejam oficialmente aprovados os métodos padrão (Malorny *et al.*, 2003).

Os alimentos oferecem bastantes desafios na aplicação de técnicas de pesquisa de microrganismos, no entanto, devido à sua complexidade e variedade torna-se difícil criar um protocolo único, comum para todos os alimentos. Métodos para extrair e concentrar os possíveis organismos patogénicos presentes e eliminar interferentes, são necessários para permitir a aplicação eficiente dos métodos de detecção molecular (Swaminathan e Feng, 1994).

Este estudo pretende otimizar uma técnica de detecção para pesquisar alguns microrganismos patogénicos em framboesas e alface, nomeadamente o vírus da hepatite A (HAV), *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Na sequência deste objetivo, pretendeu-se fazer uma pesquisa, no mercado português, utilizando o método otimizado, de microrganismos em framboesas e alface.

Relativamente à detecção do HAV, aquando da pesquisa bibliográfica, verificamos que a detecção deste tipo de microrganismos é difícil, pois ao contrário das bactérias, os vírus não crescem no alimento, e portanto é inviável realizar qualquer tipo de enriquecimento para aumentar o número de partículas virais presentes e possíveis de detetar posteriormente. Também pelo facto do tipo de alimentos que estamos a analisar (alimentos ricos em água) apresentar bastantes interferentes, leva a que seja de extrema importância a realização de uma etapa que permita a concentração do baixo número de partículas virais presente. O facto de estarmos a lidar com um vírus de ARN, implicando a sua detecção uma purificação deste ácido nucleico, a mínima contaminação durante o processo de detecção pode comprometer também os resultados.

Desta forma, e como descrito na literatura, a detecção de vírus em alimentos ricos em água (como frutas e vegetais) deve compreender três etapas principais: eluição e clarificação (etapa onde o alimento é “lavado” com um tampão de forma a extrair o vírus do alimento e eliminar interferentes); concentração (onde o vírus é concentrado de forma a ser possível deteta-lo posteriormente); extração do ácido nucleico e detecção molecular,

nesta fase o ácido nucleico (no caso do HAV é ARN) é extraído das células virais para posterior detecção por RT-PCR.

Foram experimentados quatro protocolos distintos para extração e purificação do ARN, no entanto nenhum deles permitiu que o ARN fosse concentrado/precipitado, impossibilitando assim a purificação e conseqüente detecção do mesmo.

O facto de não ser possível adquirir certos materiais/reagentes, respeitar a necessidade de trabalhar num ambiente totalmente estéril, a impossibilidade de obter um controlo positivo, e ainda questões temporais, levou a que este objetivo fosse abandonado, ficando assim pendente a pesquisa do HAV.

Abandonando-se a pesquisa do HAV, seguiu-se com a pesquisa das bactérias patogénicas, que têm sido frequentemente descritas neste tipo de alimentos (têm sido referidos alguns surtos em alguns países europeus e referenciados em relatórios da EFSA) igualmente em framboesas e alface: *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Desta forma, tentámos otimizar uma técnica para detecção o mais simples e rápida e que apresentasse fiabilidade. Decidimos então utilizar a técnica de PCR para a detecção das bactérias.

Numa primeira fase de otimização da técnica de detecção dos diferentes microrganismos, foi possível retirar algumas conclusões, nomeadamente:

- O kit de extração utilizado para extrair o ADN dos diferentes microrganismos (funcionando como controlo positivo) é eficaz, apesar de para *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* a concentração obtida não ser tão elevada como para as restantes bactérias, possivelmente resultado da menor densidade celular da cultura utilizada para a realização da extração (Tabela 3.1).
- Quando a pureza e eficiência dos reagentes de PCR foi testada, verificou-se que para todos os microrganismos os reagentes apresentaram pureza e eficiência viável (Figura 3.1; Figura 3.2; Figura 3.3; Figura 3.4); Apesar de no caso de *Escherichia coli* o *primer forward* sozinho (sem *primer reverse*) permitir uma ligação inespecífica. No entanto essa banda inespecífica é diferenciável da banda esperada, sendo que, quando a banda esperada surge, a banda inespecífica desaparece por competição da amplificação de interesse (“mais forte”) (Figura 3.2).
- Relativamente à especificidade dos *primers*, nem todos apresentaram a especificidade pretendida. No caso da detecção de *Salmonella* sp., os *primers* apresentaram

especificidade adequada, uma vez que não houve ampliações na presença de ADN molde das outras bactérias (Figura 3.5).

Para *E. coli*, apesar dos *primers* não serem totalmente específicos (uma vez que houve amplificação para *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp.), e apesar de serem visíveis outras bandas inespecíficas, a banda esperada é visível e facilmente distinguível (Figura 3.6). A amplificação de bandas inespecíficas significa que o par de *primers* de sequência do gene *malB* utilizado para *E. coli* pode ter promovido interação com outras bactérias (que não a *E. coli*) presentes na amostra.

Para *S. aureus*, os *primers* apresentam elevado grau de inespecificidade, uma vez que permitem amplificação em quase todas as bactérias, à exceção apenas da *Salmonella* sp. (Figura 3.7). Apesar da banda esperada também ser visível, iria ser difícil a distinção entre microrganismos, se numa situação estivesse presente o ADN de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Por fim, para *L. monocytogenes* a banda esperada é visível, indicando que os *primers* são específicos (Figura 3.8). No entanto é visível um arrastamento nos restantes poços, dificultando a análise e a certeza dos resultados, sendo importante a sua repetição futuramente.

- Quanto aos resultados ao teste da sensibilidade dos *primers* para diferentes concentrações de ADN dos diferentes microrganismos, foi possível verificar que para *Salmonella* sp. (Figura 3.9) a concentração mínima de ADN que foi possível detetar foi de 2µg/ml, enquanto que para *E. coli* (Figura 3.10) foi de pelo menos 0,28µg/ml e para *S. aureus* (Figura 3.11) de pelo menos 0,68µg/ml (Tabela 3.2). No caso de *L. monocytogenes* (Figura 3.12) os resultados obtidos foram inconclusivos (Tabela 3.2). Ou seja, os *primers* que apresentaram uma maior sensibilidade são os *primers* para *E. coli*.
- Relativamente à extração de ADN de framboesas e alface com recurso a um kit comercial, foi possível concluir que o kit utilizado é eficiente pois foram obtidas concentrações de ADN significativas para ambos os produtos (Tabela 3.3).

Para a análise das amostras (amostras teste, sem qualquer interesse e às quais foram “adicionado” os diferentes microrganismos, em diferentes volumes), após o pré-enriquecimento das mesmas, com água peptonada tamponada (pois normalmente as bactérias costumam estar presentes em baixas concentrações), foram testadas duas formas de preparação da amostra: uma preparação em que as amostras foram sujeitas a um passo

de rebentamento das células baseado na fervura; outra preparação onde apenas se recolheu algum volume de cultura de pré-enriquecimento diretamente para a reação de PCR.

– Relativamente aos resultados obtidos, é possível afirmar que o segundo método mencionado não permitiu obter resultados positivos em nenhuma das bactérias em estudo. Quanto ao primeiro método, este foi eficaz para bactérias Gram-negativas, ou seja, foi eficaz para *Salmonella* sp. (Figura 3.13 e Figura 3.14) e *E. coli* (Figura 3.15 e Figura 3.16), pois as células destas possuem uma parede celular fina, capaz de ser destruída por fervura, ao contrário das bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* (Figura 3.17 e Figura 3.18) e *L. monocytogenes* (Figura 3.19 e Figura 3.20), que possuem uma camada de peptidoglicano exterior espessa, e portanto a fervura não é suficiente para destruir a parede celular, e deste modo extrair o ADN para ser detetado posteriormente por PCR.

Relativamente às conclusões acerca da quantidade crescente de células “adicionadas”, verificou-se que tanto para *Salmonella* sp. como para *E. coli*, foi possível visualizar a banda esperada para todas as quantidades de células “adicionadas”, sendo a quantidade mínima detetável (que corresponde a um volume de 50µl) de  $1 \times 10^8$  UFC e  $9 \times 10^7$  UFC, respetivamente (Tabela 3.4).

De forma geral, conseguimos obter controlos positivos para todas as bactérias, os *primers* utilizados apresentam pureza e eficiência aceitável, são específicos para as bactérias, á exceção de *Staphylococcus aureus*. O método de preparação da amostra baseado na fervura permitiu obter melhores resultados, mas apenas para as bactérias Gram-negativas, sendo que a técnica de PCR conseguiu detetar *Salmonella* sp. e *E. coli* no volume “adicionado” mais pequeno (50µl).

Após otimização da técnica de deteção, foi realizada a pesquisa das bactérias em framboesas e alface à venda no mercado português. Apesar de nenhum método de preparação da amostra ter funcionado para *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, a presença destas duas bactérias foi igualmente pesquisada. Assim, para todas as bactérias em estudo, a preparação da amostra utilizada para a análise de framboesas e alface à venda no mercado português foi baseada na fervura.

Relativamente aos resultados obtidos, foi possível constatar que para *Salmonella* sp. (Figura 3.21) framboesas embaladas frescas (Marca A), congeladas (Marca B) e congeladas (Marca C) mostraram apresentar contaminação. No caso da alface embalada

fresca (Marca D) e embalada fresca (Marca F) não foi possível obter certezas pois foi possível visualizar algum arrastamento no gel. Por fim, a alface inteira fresca (Marca E), surpreendentemente foi a única amostra que não apresentou qualquer amplificação, levando a concluir que esta se apresentava livre de contaminação por *Salmonella* sp.

Uma vez que as amostras de alface embaladas frescas (produtos minimamente processados ou IV gama) são produtos prontos a consumir, ou seja, já foram higienizados em fábrica, e estão protegidos por uma embalagem plástica nas superfícies comerciais, não seria de esperar a existência de qualquer contaminação. Pelo contrário, a alface inteira fresca uma vez que não apresenta qualquer embalagem ou processamento e está à disposição do comprador, o qual pode mexer diretamente no produto, é a única amostra que não apresenta contaminação.

Já as framboesas embaladas frescas, uma vez que a embalagem tem a função apenas de proteção e não de conservação, significa que não é um produto pronto a consumir e portanto há a necessidade do consumidor lavar o produto antes de o consumir, podendo eventualmente existir alguma contaminação.

No caso das framboesas congeladas, não seria de esperar a existência de contaminação pois uma vez que a congelação para além de inibir o crescimento das bactérias, muitas vezes chega mesmo a causar a morte bacteriana; a existência de contaminação significa que antes do congelamento o produto estava contaminado.

Para *E. coli* (Figura 3.22), assim como no caso anterior (para *Salmonella* sp.) framboesas embaladas frescas (Marca A) e congeladas (Marca B e Marca C) mostraram apresentar contaminação. Já a alface embalada fresca (Marca D e F), apesar de não ser possível afirmar com certeza (pois é visível algum arrastamento), parece não existir contaminação. Por fim, e mais uma vez, a alface inteira fresca (Marca E) não exhibe qualquer contaminação com *E. coli*.

No caso de *S. aureus* (Figura 3.23), apenas framboesas congeladas (Marca B) mostrou amplificação no tamanho esperado (127pb), querendo isto significar contaminação. Framboesas congeladas (Marca D) e alface embalada fresca (Marca F) apresentaram uma banda próximo do tamanho esperado, no entanto não é possível afirmar com certeza que estas se encontram contaminadas. Uma vez mais, alface inteira fresca (Marca E) não mostrou qualquer amplificação que significasse contaminação com esta bactéria.

Relativamente a *L. monocytogenes* (Figura 3.24), não foi possível obter conclusões acerca de nenhuma das amostras, pois em nenhuma delas houve amplificação no tamanho esperado (457pb).

De forma geral, apenas a Marca E, referente à alface inteira fresca parece estar livre de qualquer contaminação com as bactérias em estudo. Quanto a *L. monocytogenes* não foi possível obter resultados, e relativamente a *S. aureus* os resultados podem não ser os mais fiáveis pois foram observadas bastantes bandas (algumas perto do tamanho esperado). O facto dos *primers* não terem mostrado especificidade adequada para *S. aureus* (ponto 3.2.3. dos resultados) e não terem sido obtidos resultados quando foram testados os métodos de preparação da amostra (ponto 3.2.6 dos resultados), leva a que os resultados obtidos para *S. aureus* não sejam totalmente fidedignos.

É importante referir o facto da técnica utilizada requerer ainda vários ajustes relativamente ao método de preparação da amostra/extração de ADN. O facto de o protocolo usado na preparação da amostra não possuir uma etapa destinada à eliminação/redução de inibidores de PCR, pode explicar o insucesso de alguns resultados obtidos.

Futuramente seria importante testar outros métodos de preparação da amostra, especialmente para as bactérias Gram-positivas. Um tratamento com lisozima, antes do rementamento celular, poderia funcionar, pois esta degradaria a camada espessa de peptidoglicano, facilitando assim a extração do ADN bacteriano.

Métodos que incluem extração com fenol/clorofórmio que tem como objetivo eliminar/reduzir inibidores, e que já foram testados por vários autores, poderia ser também uma solução para melhorar os resultados (Santos *et al.*, 2001). Também a utilização de kits de extração de ADN total, onde seria extraído ADN bacteriano e ADN do produto alimentar em estudo, seria uma boa opção, pois para além de possibilitarem a extração de ADN, também eliminam inibidores que possam estar presentes.

Ainda assim, a metodologia baseada em PCR descrita neste trabalho requer apenas 48 horas até obtenção de resultados, o que é significativamente menor comparativamente com métodos convencionais. Apresenta custos relativamente mais baixos e permite testar um grande número de amostras em simultâneo. Foi também comprovado que a inclusão de um passo de pré-enriquecimento apresenta vantagens na deteção de bactérias, uma vez que

para além de aumentar o número de células bacterianas de forma a ser possível a sua deteção, também permite diluir substâncias que possam inibir o PCR.

Relativamente ao estudo do consumo de produtos hortofrutícolas minimamente processados, alface e framboesas, é possível afirmar que o perfil do consumidor, segundo este estudo, é caracterizado por indivíduos com idades entre 18 e 25 anos, maioritariamente do sexo feminino, com habilitações literárias ao nível da licenciatura.

Grande parte dos inquiridos afirma consumir produtos hortofrutícolas minimamente processados. Uma vez que a grande maioria dos inquiridos possui idades entre os 18 e 25 anos, a resposta afirmativa pode dever-se ao facto de grande parte destes ainda estar a estudar, longe da sua área de residência, daí a compra deste tipo de produtos por serem de fácil consumo, uma vez que já se encontram preparados fisicamente.

A maioria dos inquiridos afirma lavar, com água, estes produtos, embora já tenham sido lavados na indústria, pois são produtos prontos a consumir. Isto representa uma boa prática, apesar de apenas a água poder não ser totalmente eficiente na remoção de possíveis contaminações, ao contrário de certos produtos já à venda no mercado como a Amukina e o Dettol, produtos utilizados por uma minoria de inquiridos (2 e 1, respetivamente). Por outro lado, também o vinagre, usado por 18 inquiridos, é um produto eficaz na redução microbiana, como comprovado por vários autores como Ramos *et al.* (2014) que comprovou a eficácia do vinagre balsâmico para reduzir *Listeria monocytogenes* em alface; Figueiredo (2013) utilizou uma solução de vinagre com cloro para desinfetar alface que se mostrou bastante eficiente; Santos *et al.* (2010) experimentou quatro soluções de tratamento para eliminação/redução de estirpes de *E. coli* (sumo fresco de limão, vinagre e álcool, mistura de sumo de limão-vinagre e mistura de sumo de limão-vinagre-água) comprovando que a mistura de sumo de limão e vinagre proporcionou maiores reduções de *E. coli* 0157:H7, enquanto que o tratamento com vinagre foi mais eficaz contra indígenas de estirpes de *E. coli*. No entanto, torna-se difícil para o consumidor saber qual a dosagem de vinagre ideal.

Um estudo de Bidawid *et al.* (2000) concluiu que em condições experimentais, a água de lavagem, de forma abundante, por si só reduziu a quantidade do HAV transferido dos dedos para a alface. Portanto, independentemente do uso de algum desinfetante, o produto deve ser lavado, principalmente os que não se enquadram na designação de prontos a consumir, com água potável, corrente e abundante.

A utilização de lixívia, utilizada por 2 inquiridos, e limão, utilizado por 1, assim como no vinagre, torna-se difícil a sua utilização pois não se sabe ao certo a quantidade ideal, daí existirem produtos à venda no mercado que são de fácil utilização e os quais indicam a dosagem a utilizar.

Quanto ao consumo de alface, a maioria afirma consumir 3 a 5 vezes/semana, adquirindo-a em superfícies comerciais inteira fresca.

Relativamente ao consumo de framboesas este não é um produto tão consumido como a alface, sendo que a grande maioria dos inquiridos afirma consumir apenas esporadicamente, adquirindo-a em superfícies comerciais embaladas frescas. O facto de ser uma fruta com um custo mais elevado pode explicar o baixo consumo deste produto.

Deste modo, importa realçar que, ao contrário das framboesas, o elevado consumo de alface merce que sejam tomadas medidas de prevenção, nomeadamente na sua higienização antes do consumo, principalmente quando consumida fresca. No entanto, a ocorrência nos últimos anos de vários surtos em frutos vermelhos, leva a que seja recomendável a existência de uma atenção acrescida.

A etapa de lavagem/desinfecção é das mais importantes, na medida em que é responsável por assegurar a segurança alimentar no momento de consumo, pois auxiliam na remoção e/ou eliminação de parte da carga microbiana destes alimentos, consumidos crus.

#### **4.1. Limitações do estudo**

Dada a dificuldade que advém da deteção de vírus em alimentos, em termos de matérias, métodos e tempo, tornou-se difícil concretizar o objetivo da deteção do vírus da hepatite A nas amostras em estudo. Como já foi referido, é necessário um método rigoroso, em que o ambiente deve ser totalmente estéril, assim como o material e soluções utilizadas, o que nem sempre foi possível. Também o facto de normalmente as partículas virais estarem presentes em concentrações muito baixas tornou a deteção pouco rigorosa, impossibilitando assim a obtenção de resultados válidos.

Outras limitações do presente estudo, relativamente à deteção de bactérias, prendem-se com a escassez de tempo (e por vezes disponibilidade) para testar e otimizar outros métodos de extração de ADN das bactérias em estudo, bem como repetir os que foram testados, o que comprometeu a qualidade de alguns dos resultados obtidos. No que

concerne à metodologia baseada em PCR, sabemos que existem diversas substâncias que a podem inibir, além de poder ser influenciada pelo método de extração de ADN e ainda pelo tipo e duração do processo de enriquecimento prévio. O que denota desde logo a necessidade de um estudo de cada tipo de alimento e da adaptação da metodologia de forma específica a cada matriz de alimento, para deste modo haver processos *standard* para cada binómio agente patogénico/matriz de alimento, e assim podermos obter resultados mais comparáveis e mais fiáveis.

## 5. Referencias Bibliográficas

Abraham, A., *et al.* (2012). “Bad Bug Book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins”. 2ª edição. FDA.

AIT (2013). “Food of plant origin: production methods and microbiological hazards linked to food-borne disease. Reference: CFT/EFSA/BIOHAZ/2012/01 Lot 1 (Food of plant origin with high water content such as fruits, vegetables, juices and herbs)”. Supporting Publications. EN-402.

Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Figge, M. J. e Abadias, M. (2013). “Control of foodborne pathogens on fresh-cut fruit by a novel strain of *Pseudomonas graminis*”. *Food Microbiology*, 34: 390-399.

Almeida, D. (2005). “Manuseamento de Produtos Hortofrutícolas”. [Consultado em: 23/06/2014]. Disponível em: < [http://www2.spi.pt/agrovalorizacao/docs/Manual\\_II.pdf](http://www2.spi.pt/agrovalorizacao/docs/Manual_II.pdf)>.

Almeida, I. e Bernardo, F. (2007). “RASFF: O Sistema de Alerta Rápido”. *Revista Sequali*, 3: 26-30.

Alves, R. M. e Sousa, M. (2008). “Atmosferas Modificadas: Evolução na conservação de produtos alimentares”. *Revista Sequali*, 4: 40-43.

ASAE (2014). Autoridade de Segurança Alimentar e Económica: Órgão de Polícia Criminal. [Consultado em: 3/07/2014]. Disponível em: < <http://www.asae.pt/>>.

Baert, L., Uyttendaele, M. e Debevere, J. (2008). “Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection”. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2): 101-108.

Baptista, P., Noronha, J., Oliveira, J. e Saraiva, J. (2003). “Modelos genéricos de HACCP”. 2ª edição. Guimarães: Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, Lda.

Bastos, M. (2006). “Frutas Minimamente Processadas: Aspectos de Qualidade e Segurança”. [Consultado em: 23/05/2014]. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/frutasminimamenteprocessadas\\_000fd ejd97n02wx5eo0a2ndxyb8wg7w1.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/frutasminimamenteprocessadas_000fd ejd97n02wx5eo0a2ndxyb8wg7w1.pdf)>.

Becker, K., Roth, R. e Peters, G. (1998). “Rapid and Specific Detection of Toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of Two Multiplex PCR Enzyme Immunoassays for Amplification and Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene”. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9): 2548-2553.

Bidawid, S., Farber, J. M. e Sattar, S. A. (2000). “Contamination of Foods by Food Handlers: Experiments on Hepatitis A Virus Transfer to Food and Its Interruption”. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7):2759-2763.

Butot, S., Putallaz, T. e Sánchez, G. (2007). “Procedure for Rapid Concentration and Detection of Enteric Viruses from Berries and Vegetables”. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1): 186-192.

Calhau, M. (2014). “Toxinfeções alimentares, um problema de Saúde Pública”. *Observações-Boletim Epidemiológico*. [Consultado em: 18/05/2014]. Disponível em: <[http://repositorio.insa.pt/retrieve/6687/Boletim\\_Epidemiologico\\_Observacoes\\_7\\_2014.pdf](http://repositorio.insa.pt/retrieve/6687/Boletim_Epidemiologico_Observacoes_7_2014.pdf)>.

Campotec sd. “4ªGama”. [Consultado em: 23/06/2014]. Disponível em: <<http://www.campotec.pt/pt/quartagama>>.

Canas, W. F., e Sousa, J. C. F. (2002). “Microbiologia: Volume 3”. Editora Lidel. Lisboa.

CDC (2013). “Multistate outbreak of hepatitis A virus infections linked to pomegranate seeds from Turkey (Final Update)”. [Consultado em: 27/06/2014]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hepatitis/outbreaks/2013/a1b-03-31/index.html>>.

Cefas (2012). “Generic Protocol: Qualitative detection of norovirus and hepatitis A virus in soft fruit”. Technical Manager, Shellfish Virology.

Chang, S., Puryear, J. e Cairney, J. (1993). “A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees”. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11, 113-116.

Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C. e Comi, G. (2002). “Direct Identification in Food Samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods”. *Applied and Environment Microbiology*, 68(2): 6273-6282.

Codex Alimentarius Commission (2003). “Code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables”. FAO, CAC/RCP 53.

Comissão das Comunidades Europeias (2005). “Documento de orientação sobre a aplicação de procedimentos baseados nos princípios HACCP e sobre a simplificação da aplicação dos princípios HACCP em determinadas empresas do sector alimentar”. [Consultado em: 1/08/2014]. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/hygienelegislation/guidance\\_doc\\_haccp\\_pt.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/hygienelegislation/guidance_doc_haccp_pt.pdf)>.

Croci, L., Delibato, E., Volpe, G., Medici, D. e Palleschi, G. (2004). “Comparison of PCR, Electrochemical Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, and the Standard Culture Method for Detecting *Salmonella* in Meat Products”. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3): 1393-1396.

Croci, L., *et al.* (2008). “Current Methods for Extraction and Concentration of Enteric Viruses from Fresh Fruit and Vegetables: Towards International Standards”. *Food Analytical Methods*, 1, 73-84.

Donnan, E. J., *et al.* (2012). “A Multistate Outbreak of Hepatitis A Associated With Semidried Tomatoes in Australia, 2009”. *Clinical Infectious Diseases Advance Access published*.

Dubois, E., *et al.* (2007). “Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: characterization of the method performances”. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2): 141-149.

Dubois, E., *et al.* (2002). “Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture”. *Journal of Food Protection*, 65(12): 1962-1969.

EFSA (2011b). “EFSA issues advice to mitigate risks from possible exposure to STEC in vegetables”. [Consultado em: 25/06/2014]. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/110609.htm>>.

EFSA (2011c). “Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses”. *EFSA Journal*, 9(7): 2190.

EFSA (2011a). “Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock”. *EFSA Journal*, 9(10):2390.

EFSA (2012). “Scientific Opinion on Public health risks represented by certain composite products containing food of animal origin”. *EFSA Journal*, 10(5):2662.

EFSA (2013). “Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations)”. *EFSA Journal*, 11(1):3025.

EFSA (2014). “Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in berries)”. *EFSA Journal*. 12(6):3706.

EFSA/ECDC (2014b). “Rapid Outbreak Assessment: Outbreak of hepatitis A in EU/EEA countries – Second update, 11 April 2014”.

EFSA/ECDC (2011). “The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009”. 9(3): 2090.

EFSA/ECDC (2014a). “The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012”. *EFSA Journal*. 12(2):3547.

European commission (2002). “Risk Profile on the Microbiological Contamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw: Report of the Scientific Committee on Food”. European commission. Bruxelas.

FAO, Ministério da Saúde de Portugal/Direcção Geral da Saúde, Instituto de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Ministério da Saúde do Brasil (2005). “Workshop sobre a Promoção de Hortofrutícolas nos Países de Expressão Portuguesa: Relatório de um workshop conjunto”, Lisboa.

FDA (1998). “Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables”. [Consultado em: 1/08/2014]. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM169112.pdf>>.

Figueiredo, F. (2013). “Desinfecção de alfaces por ação do cloro e do vinagre e desenvolvimento de um sistema de segurança para alface em estabelecimentos de restauração coletiva”. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Fiore, A. E. (2004). “Hepatitis A Transmitted by Food”. CDC. Food Safety, 38:705-715.

FIPA (2002). “Segurança Alimentar”. [Consultado em: 17/05/2014]. Disponível em: <<http://www.agroportal.pt/a/2002/fipa.htm>>.

Food Safety News (2013). “Hepatitis A Outbreak Now at 162 Cases in 10 States”. [Consultado em: 27/06/2014]. Disponível em: <<http://www.foodsafetynews.com/2013/09/cdc-hepatitis-a-outbreak-now-at-162-cases-in-10-states/#.VA8tgjxdUk1>>.

Forsythe, S. J. (2002). “Microbiologia da Segurança Alimentar” (Guimarães, M. C. M. e Leonhardt, C. trads.). Editora Artmed. (Livro original em Inglês publicado em 2000). Porto Alegre.

Fortin, M. (1999). “O processo de investigação – Da concepção à realização”. Editora Lusociência. Loures.

Friesema, I., *et al.* (2008). “An international outbreak of Shiga toxin-Producing Escherichia coli 0157 infection due to lettuce, September – October 2007”. [Consultado em: 27/06/2014]. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19065>>.

Gallot, C., *et al.* (2011). “Hepatitis A Associated with Semidried Tomatoes, France, 2010”. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3): 566-567.

Goodbum, C. e Wallace, C. A. (2013). “The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review”. *Food Control*, 32: 418-427.

Gouvêa, R. (2009). “Comparação entre isolamento bacteriológico convencional e PCR na detecção de Salmonella spp. Em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas e de campo”. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense, Niterói.

Hui, Y. H., Sattar, S. A., Murrell, K. D., Nip, W. e Stanfield, P. S., eds (2001). “Foodborn Disease Handbook: Volume 2: Viruses, Parasites, Pathogens, and HACCP”. [Consultado em: 13/05/2014]. Disponível em: <[http://books.google.pt/books?id=zN36ReYqv4kC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=true](http://books.google.pt/books?id=zN36ReYqv4kC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=true)>.

INE (2014). “Balança Alimentar Portuguesa 2008-2012”. [Consultado em: 15/05/2014]. Disponível em: <[http://www.ine.pt/ngt\\_server/attachfileu.jsp?look\\_parentBoui=215764202&att\\_display=n&att\\_download=y](http://www.ine.pt/ngt_server/attachfileu.jsp?look_parentBoui=215764202&att_display=n&att_download=y)>.

Irvine, W. N., *et al.* (2009). “Investigation of an outbreak of Salmonella enterica serovar Newport infection”. *Epidemiology & Infection*, 137(10): 1449-1456.

ISO 9000:2005. Sistemas de gestão da qualidade: Fundamentos e vocabulário. Instituto Português da Qualidade. Monte da Caparica.

ISO 22000:2005. Sistemas de gestão da qualidade: Requisitos para qualquer organização que opere na cadeia alimentar. Instituto Português da Qualidade. Monte da Caparica.

Joshi, M. (2010). “Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application”. *International Journal of Biomedical Research*, 1(5): 81-97.

Kong, R. Y. C., Lee, S. K. Y., Law, T. W. F., Law, S. H. W. e Wu, R. S. S. (2002). “Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR”. *Water research*, 36, 2802-2812.

Lamikanra, O., ed. (2002). “Fresh-cut Fruits and Vegetables”. CRC Press LLC. Washington, D.C.

Lee, P., Costumbrado, J., Hsu, C. e Kim, Y. (2012). “Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments”. *Journal of Visualized Experiments*, 62, 1-5.

Liang, N., Dong, J. e Li, Y. (2011). “Detection of viable Salmonella in lettuce by propidium monoazide real-time PCR”. *Journal of Food Science*. 76(4): 234-237.

López-Campos, G., Martínez, S. J. V., Aguado-Urda, M. e López-Alonso, V. (2012). “Detection, Identification, and Analysis of Foodborne Pathogens. Em Microarray Detetion and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens (Secção 2). [Consultado em: 2/09/2014]. Disponível em: <[link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4614-3250-0\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4614-3250-0_2)> Detection, Identification, and Analysis of Foodborne Pathogens>.

Makary, P., *et al.* (2009). “Multiple norovirus outbreaks among workplace canteen users in Finland, July 2006”. *Epidemiology & Infection*, 137(3): 402-407.

Malorny, B., Tassios, P. T., Radstrom, P., Cozinhe, N., Wagner, M. e Hoorfar, J. (2003). “Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens”. *International Journal of Food Microbiology*, 83(1):39-48.

Martins, M. M. (2007). “Produtos minimamente processados. Definições, processamento e factores de qualidade”. [Consultado em: 23/06/2014]. Disponível em: <[http://www.isa.utl.pt/files/pub/ensino/formacao/TPC\\_Comicacoes/Dia02/09\\_Def\\_Qual.pdf](http://www.isa.utl.pt/files/pub/ensino/formacao/TPC_Comicacoes/Dia02/09_Def_Qual.pdf)>.

Martín-Belloso, O. e Soliva-Fortuny, F., eds (2011). “Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing”. [Consultado em: 15/05/2014]. Disponível em: <[http://books.google.com.br/books?id=KnJpm2YpUK4C&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=true](http://books.google.com.br/books?id=KnJpm2YpUK4C&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=true)>.

Maurer, J. (ed) (2006). “PCR Methods in Foods”. Editora Springer. USA.

Mertens, E., Kreher, H., Rabsch, W., Bornhofen, B., Alpers, K. e Burckhardt, F. (2012). “Severe infections caused by Salmonella Enteritidis PT8/7 linked to a private barbecue”. *Epidemiology & Infection*. 141(2): 277-283.

Morais, C. (2005). “Escala de Medida, Estatística Descritiva e Inferência Estatística”. Escola Superior de Educação - Instituto Politécnico de Bragança. Bragança.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S. e Pfaller, M. A. (2000). “Microbiologia Médica”. 3ª edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

Naravaneni, R. e Jamil, K. (2005). “Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques”. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 51-54.

Olaimat, A. N. e Holley, R. A. (2012). “Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review”. *Food Control*, 32: 1-19.

Passo, M. (2009). “Desenvolvimento de Métodos Moleculares para Avaliação da Qualidade e Segurança Microbiológica em Produtos Alimentares”. Tese de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências – Universidade de Lisboa, Lisboa.

Pereira, F. E. L. e Gonçalves, C. S. (2003). “Hepatite A”. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: 387-400.

Pinto, P. M. Z. e Morais, A. M. M. B. (2000). “Boas Práticas para a conservação de Produtos Hortofrutícolas”. 1ª edição, AESBUC – Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica, Porto.

Ramos, B., Brandão, T., Teixeira, P. e Silva (2014). “Balsamic vinegar from Modena: An easy and effective approach to reduce *Listeria monocytogenes* from lettuce”. *Food Control*, 42:38-42.

Ramos, B., Miller, F. A., Brandão, T. R. S., Teixeira e P., Silva, C. L. M. (2013). “Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety”. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20: 1-15.

RASFF (2013). “Preliminary Annual Report”. [Consultado em: 3/08/2014]. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff\\_annual\\_report\\_2013.pdf](http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2013.pdf)>.

Regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, 30.04.2004. L139/1.

Rodríguez-Lázaro, D., *et al.* (2012). “Virus hazards from food, water and other contaminated Environments”. *FEMS Microbiology*, 36: 786-814.

Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M. e Laurent, P. (2002). “Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches”. *Journal of Microbiological Methods*. 49(1):31-54.

Sambrook, J. e Russel, D. W. (2006). “Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform”. [Consultado em: 15/03/2014]. Disponível em: <<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.prot4455>>.

Santos, L. R., *et al.* (2001). “Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detetion of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat”. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 43(5):247-250.

Santos, Y., Almeida, R., Guimarães, A. e Almeida, P. (2010). “Hygienic-sanitary quality of vegetables and evaluation of treatments for the elimination of indigenous *E. coli* and *E. coli* O157:H7 from the surface of leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L.)”. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4): 1083-1089.

Santos, M. I., *et al.* (2012). “Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal”. *Food Control*, 23: 275-281.

Scherer, K., Johne, R., Schrader, C., Ellerbroek, L., Schulenburg, J. e Klein, G. (2010). “Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak”. *Journal of Virological Methods*, 1698(1): 22-27.

Shearer, A. E., Strapp, C. M. e Joerger, R. D. (2001). “Evaluation of a polymerase chain reaction-based system for detection of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., and *Listeria monocytogenes* on fresh fruits and vegetables”. *Journal of Food Protection*, 64(6): 788-95.

Soderstrom, A., *et al.* (2008). “A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce”. *Foodborne Pathogens and Disease*. 5(3): 339-349.

Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E. e Uyttendaele, M. (2010). “Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits”. *Food Microbiology*, 28(1): 52-58.

Stals, A., Baert, L., Coillie, E. e Uyttendaele, M. (2012). “Extraction of food-borne viruses from food samples: A review”. *International Journal of Food Microbiology*. 153, 1-9.

Swaminathan, B. e Feng, P. (1994). “Rapid Detetion Of Food-borne Pathogenic Bacteria”. *Annual Review of Microbiology*, 48:401-426.

Tankkien, J. Maija-Nakari, U., Johansson, T., Niskanen, T., Siitonen, A. e Kuusi, M. (2005). “A nationwide outbreak of multiresistant *Salmonella* Typhimurium in Finland due to contaminated lettuce from Spain, May 2005”. [Consultado em: 27/06/2014]. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2734>>.

Tiago, C. (2010). “Implementação de um sistema de gestão da qualidade e segurança alimentar segundo o global standard for food safety, numa empresa de embalagem e distribuição de frutos”. Tese de Mestrado em Segurança Alimentar. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Vaz, A., Moreira, R. e Hogg, T. (2010). “Introdução ao HACCP”. 1ª edição, AESBUC – Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica, Porto.

Veiga, A., *et al.* (2012). “Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal”. [Consultado em: 25/05/2014]. Disponível em: <<http://www.fipa.pt/userfiles/file/i005411.pdf>>.

WHO sd. “Who European Action Plan for Food and Nutrition Policy 2007-2012”. WHO.

WHO (2003). “Fruit and Vegetable Promotion Initiative/A Meeting Report”. WHO. Geneva.

WHO (2000). “Hepatitis A”. [Consultado em: 4/04/2014]. Disponível em: <[http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisA\\_who.cdscsredc2000\\_7.pdf](http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisA_who.cdscsredc2000_7.pdf)>.

WHO/FAO (2003). “Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases”. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. WHO. Geneva.

WHO/FAO (2008). “Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables: Meeting Report”. Microbiological Risk Assessment Series. Geneva.

WHO/FAO (1998). “Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review/prepared by Larry R. Beuchat”. WHO/FSF/FOS/98.2.

## Anexos

### Anexo I

#### Inquérito por questionário sobre o consumo de hortofrutícolas minimamente processados, framboesas e alface

---

##### CONSUMO DE HORTOFRUTÍCOLAS MINIMAMENTE PROCESSADOS, FRAMBOESAS E ALFACE

O presente questionário enquadra-se no trabalho de investigação para obtenção do Grau Mestre no âmbito do curso de mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar na Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria.

No sentido de conhecer o consumo de hortofrutícolas minimamente processados assim como de framboesas e alface, agradecemos a sua colaboração ao preencher este questionário. O seu contributo é muito importante para a obtenção de resultados e sucesso na realização desta investigação.

Este questionário levará apenas alguns minutos, sendo garantida total confidencialidade.

Obrigada pelo seu tempo!

Mariana Carlos

#### 1. Idade:

#### 2. Género:

- Feminino
- Masculino

#### Habilitações literárias:

- 1º Ciclo
- 2º Ciclo
- 3º Ciclo
- Secundário
- Bacharelato

- Licenciatura
- Pós-Graduação
- Mestrado
- Doutorado
- Outra:

### **Consumo de hortofrutícolas minimamente processados**

Hortofrutícolas minimamente processados são frutas e vegetais que são submetidos no seu estado fresco, a um conjunto de operações unitárias simples que envolvem lavagem, descasque, corte e/ou embalagem. Desta forma, podem ser consumidos ou cozinhados prontamente.

#### **4. Consume produtos frescos minimamente processados?**

Se a resposta for "Não", passe para a questão número 11.

- Sim
- Não

#### **5. Com que frequência consome produtos minimamente processados?**

- 1-3 vezes por semana
- Todos os dias
- Esporadicamente

#### **6. Habitualmente, costuma lavar, com água, os produtos minimamente processados antes do seu consumo?**

Se a resposta for "Não", passe para a questão número 11.

- Sim
- Não

#### **7. Para além da água, utiliza algum produto para a desinfeção?**

Se a resposta for "Não", passe para a questão número 11.

- Sim

- Não

**8. Qual o produto de desinfecção que utiliza habitualmente?**

**Consumo de framboesas e alface**

**9. Relativamente ao vegetal alface, com que frequência o consome?**

Se a resposta for "Nunca" ou "Apenas misturada com outros produtos", passe para a questão número 14.

- Nunca
- Apenas misturada com outros produtos
- Esporadicamente
- 1-2 vezes por semana
- 3-5 vezes por semana
- Diariamente

**10. Na maioria das vezes, onde costuma adquirir a alface?**

- Superfícies comerciais
- Plantação própria
- Plantação de outras pessoas
- Outra:

**11. Se na questão anterior respondeu "Superfícies comerciais", de que forma adquire normalmente a alface?**

Se não respondeu "Superfícies comerciais", passe para a questão 14.

- Pré-cortada e embalada
- Inteira fresca
- Outra:

**12. Relativamente à fruta framboesa, como classifica o seu consumo?**

Se a resposta à pergunta for "Nunca" ou "Apenas misturados com outros produtos" o seu questionário termina aqui.

- Nunca
- Apenas misturado com outros produtos
- Esporadicamente
- 1-2 vezes por semana
- 3-5 vezes por semana
- Diariamente

**13. Na maioria das vezes, onde costuma adquirir as framboesas?**

- Superfícies comerciais
- Plantação própria
- Plantação de outras pessoas
- Outra:

**14. Se na questão anterior respondeu "Superfícies comerciais", de que forma adquire normalmente as framboesas?**

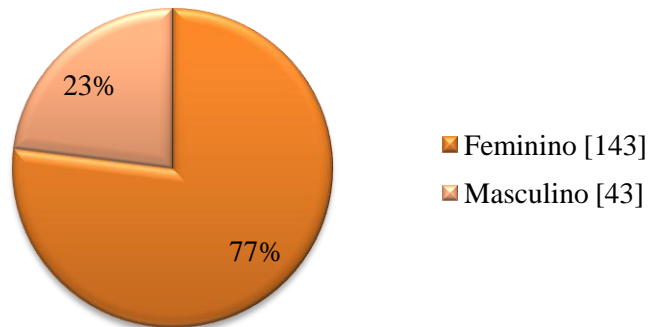
Se não respondeu "Superfícies comerciais", o seu questionário termina aqui.

- Congeladas
- Misturadas com outras frutas e embaladas
- Embaladas inteiras frescas
- Outra:

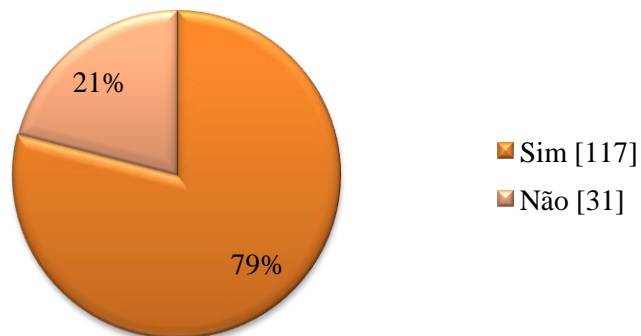
## Anexo II

### Resultados estatísticos do questionário

#### Q2. Género



#### Q6. Habitualmente, costuma lavar, com água, os produtos frescos minimamente processados antes do seu consumo?



#### Q7. Para além da água, utiliza algum produto para a desinfeção?

