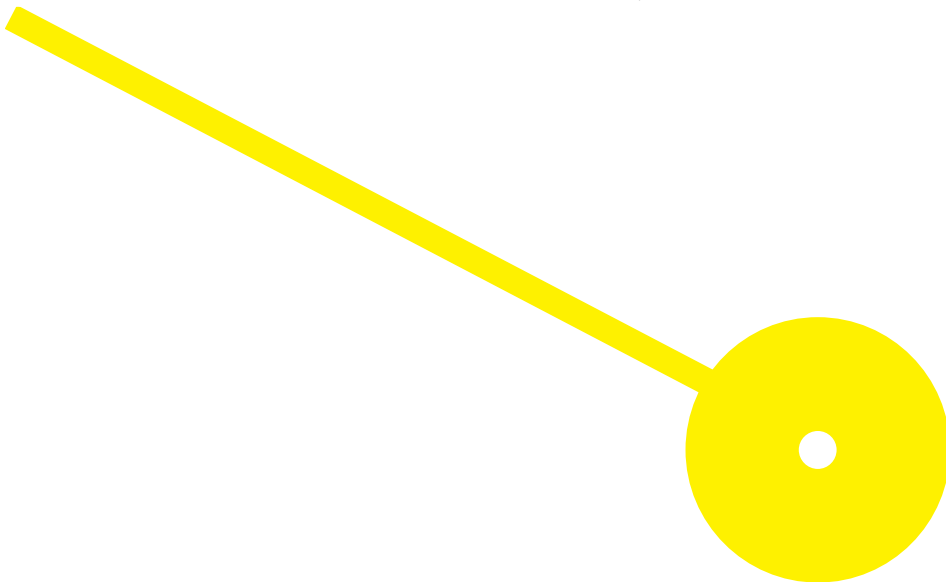


Microbiologia da Cadeia Alimentar: Análise do impacto da ISO/TS 17728:2015 e cálculo de incertezas

Cláudia Isabel Gomes da Silva Alvim Braga

12/2020





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



E Q U I L I B R I U M

Microbiologia da Cadeia Alimentar: Análise do impacto da ISO/TS 17728:2015 e cálculo de incertezas

Autor

Cláudia Isabel Gomes da Silva Alvim Braga

Orientadora

Professor Especialista | Maria Manuela Amorim de Silva e Sousa | Escola Superior de Saúde do Porto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública** – Área de especialização em **Microbiologia e Saúde Pública** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Aos meus Padrinhos, por me terem possibilitado esta aventura e por me apoiarem em todo o meu percurso acadêmico e por terem acreditado em mim.

Aos meus Pais, por nunca me terem cortado as asas, deixando-me sempre seguir os meus sonhos.

Aos amigos que levo para a vida desta aventura, Andreia, Rita, Micael e Márcia, pela amizade, companheirismo e apoio nos momentos difíceis, por não deixarem de acreditar em mim e ajudarem sempre que me sentia desanimada.

Ao Rui, pelos anos de amizade, que estando longe ou perto, nunca deixou de me apoiar e acreditar no que era capaz.

À Professora Manuela Amorim, pela paciência ao longo destes dois anos, pelo apoio e ajuda.

À empresa EQUILIBRIUM, pela possibilidade do estágio e pela oportunidade de crescer como profissional.

E por último, ao David, por ter sido o meu maior apoio ao longo destes anos, aturando-me sempre em todos os momentos, por nunca me ter deixado desistir. Obrigada por estares do meu lado.

Resumo

A segurança alimentar é fundamental para o controlo de surtos de origem alimentar. A importância de garantir a segurança alimentar a nível microbiológico impulsiona a existência de métodos padronizados, como as normas da *International Standardization Organization* (ISO).

De forma a garantir que os resultados das análises pelo laboratórios sejam fiáveis, é importante que a incerteza que afeta os resultados seja determinada. Esta incerteza englobe todo o processo de análise da amostra, sendo dividida em incerteza da amostragem e a incerteza da medição. Enquanto a incerteza da medição já é reconhecida em microbiologia, através da ISO 19036:2019, a incerteza da amostragem mantém uma lacuna de dados e de métodos para o seu cálculo.

Este relatório teve como objetivos: 1) Comparar a norma implementada no laboratório onde foi realizado o estágio, a ISO 7218:2007, e a norma de interesse a estudar se é de implementar, a ISO/TS 17728:2015; 2) Cálculo da incerteza da amostragem e medição através do guia da Relacre; 3) Análise e reflexão dos valores obtidos da incerteza.

Metodologia: Realizou-se um estudo comparativo entre as duas normas, a ISO 7218:2007 e a ISO 17728:2019 onde foram identificadas semelhanças e principais diferenças, e realizou-se o cálculo das incertezas baseado no guia da RELACRE para as matrizes em estudo.

Resultados: A implementação da norma ISO/TS 17728:2015 não se mostra vantajosa face ao método interno já implementado no laboratório, estando este atual, cumprindo os requisitos, demonstrando confiabilidade dos resultados fornecidos pelo laboratório

Os dois métodos de cálculo utilizados para o cálculo das incertezas tanto da análise como da amostragem obtiveram resultados semelhantes para as amostras de zaragatoa.

Palavras-chave: Controlo de qualidade, Microbiologia Alimentar, Cálculo de Incertezas, Amostragem, Normas ISO, ANOVA, Cálculo de duplicados, Contagem de colónias

Abstract

Food safety is vital for controlling food-borne outbreaks. The importance of ensuring food safety at the microbiological level drives the existence of standardized methods, such as the standards of the International Standardization Organization (ISO).

To ensure that the results of analyzes by the laboratory are reliable, it is important that the uncertainty affecting the results is determined. This uncertainty includes the entire sample analysis process, being divided into sampling uncertainty and measurement uncertainty. While measurement uncertainty is already recognized in microbiology, through ISO 19036: 2019, sampling uncertainty maintains a data and method gap for its calculation.

This report aimed to: 1) Compare the standard implemented in the laboratory where the internship was carried out, ISO 7218: 2007, and the standard of interest to be studied if it is to be implemented, ISO / TS 17728: 2015; 2) Calculation of sampling and measurement uncertainty using the Relacre guide; 3) Analysis and reflection of the values obtained from the uncertainty.

Methodology: A comparative study was carried out between the two standards, ISO 7218: 2007 and ISO 17728: 2019, where similarities and main differences were identified, and uncertainty was calculated based on the RELACRE guide for the matrices under study.

Results: The implementation of the ISO / TS 17728: 2015 standard does not prove to be advantageous in view of the internal method already implemented in the laboratory, being this current, fulfilling the requirements, demonstrating reliability of the results provided by the laboratory.

The two calculation methods used to calculate the uncertainties of both analysis and sampling obtained similar results for the swab samples.

Keywords: Quality control, Food Microbiology, Measurement uncertainty, Food Sampling, ISO Standards, ANOVA, Colony Counts, Analysis of uncertainty

Índice

1. Instituição e Contextualização do estágio	1
1.1. Caracterização do laboratório do estágio	1
1.2. Objetivo do estágio	1
2. Introdução	3
2.1. Doenças de origem alimentar e segurança alimentar	3
2.2. Organização Internacional de Padronização	6
2.3. Importância da amostra e da sua Incerteza	8
3. Material e métodos	11
3.1. Comparação da norma ISO 7218:2007 Amenda 2013 com a norma da ISO/TS 17728:2015. 11	
3.2. Protocolo experimental para o cálculo das incertezas	11
3.2.1. Amostras alimentares e método escolhido	11
3.2.2. Preparação das amostras	11
3.2.3. Meios e condições de incubação	12
3.3. Contagem de unidades formadoras de colônias	12
3.4. Cálculo de Incertezas	13
3.4.1. Análise de amplitudes de duplicados	13
3.4.2. Análise ANOVA	16
3.4.2.1 Cálculo variância da análise	16
3.4.2.2 Cálculo variância amostragem	18
3.5. Análise estatística	19
4. Resultados e discussão	20
4.1. Comparação das norma	20
4.1.1. Âmbito/Enquadramento	21
4.1.2. Referências normativas	22
4.1.3. Termos e definições	22
4.1.4. Princípios e requisitos gerais	22
4.1.5. Pessoal	23
4.1.6. Preparação do material de laboratório	24
4.1.7. Plano de amostragem	25

4.1.8.	Equipamento e utensílios.....	25
4.1.9.	Técnicas de amostragem.....	26
4.1.10.	Embalamento e rotulagem.....	26
4.1.11.	Preparação do relatório de amostragem.....	27
4.1.12.	Transporte.....	28
4.1.13.	Receção e Armazenamento.....	29
4.1.14.	Anexos.....	29
4.2.	Cálculo das Incertezas.....	30
4.2.1.	Contagem de colónias.....	30
4.2.2.	Análise de amplitudes de duplicados.....	33
4.2.3.	Análise ANOVA.....	38
5.	Conclusão.....	41
5.1.	Estudo comparativo das normas.....	41
5.2.	Cálculo das Incertezas.....	42
6.	Referências Bibliográficas.....	44
7.	Anexo 1- Tabela de comparação entre as normas ISO 7218:2007 Amd 2013 e ISO/TS 17728:2015.....	49
7.1.	Anexo 2 :Cálculo da incerteza da medição (análise) usando o método ISO 19036:2019 para a matriz higiene de superfícies (zaragatoa).....	58

Lista de Siglas e Abreviaturas

An _{ANOVA}	Análise ANOVA
An _{dup}	Análise de amplitudes de duplicados
CM	Critérios Microbiológicos
DOA	Doenças de Origem Alimentar
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Doenças, do inglês <i>European Center Disease Control</i>
IPAC	Instituto Português de Acreditação
ISO	Organização Internacional de Padronização, do inglês <i>International Standardization Organization</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Plate Count Agar
UE	União Europeia
UFC	Unidades formadoras de colónias

Índice de Figuras

Figura 1- (A) Número de surtos de origem alimentar, reportados por países europeus ao ECDC durante o período 2012-2018; (B) Número de pessoas afetadas pelos surtos de origem alimentar, reportados por países europeus ao ECDC durante o período 2012-2018; (C) Enumeração dos 10 principais agentes identificados responsáveis por surtos alimentares reportados ao ECDC durante o ano de 2018. Foram selecionados os agentes que possíveis de serem identificados, tendo havido um grande número de surtos onde não foi possível identificar o agente responsável. Adaptado de EFSA et al. 2019.....	3
Figura 2- Número de surtos de origem alimentar, pessoas afetadas nesses surtos e consequentes hospitalizações em Portugal durante o período de 2012-2018. Dados provenientes dos relatórios anuais do ECDC durante os anos de 2012 a 2018.....	4
Figura 3 - Timeline de regulamentos criados pela União Europeia entre 2002 e 2005 para regulamentação alimentar. (12-16).....	6
Figura 4 - Diagrama do processo analítico da quantificação de microrganismos, desde o ponto de amostragem até à quantificação. Adaptado de Nordest (2020).....	9
Figura 5 - Diagrama de causa-efeito de possíveis fontes que contribuem para a incerteza. Adaptado de Gron et al. (2007).....	10
Figura 6 - Esquema do protocolo geral utilizado para a realização de diluições para análise dos alimentos por contagem de colónias.	12

Índice de Tabelas:

Tabela 1- Cálculo da incerteza de amostragem com base na análise de amplitudes de duplicados. Adaptado do Guia da RELACRE (42).....	16
Tabela 2- Cálculos necessários, através da Análise ANOVA para o cálculo da incerteza da análise, através do cálculo da variância da análise, usando 2 ensaios e 2 duplicados. Adaptado do Guia RELACRE 28: Amostragem de águas (42).....	18
Tabela 3 - Cálculos necessários, através da Análise ANOVA para o cálculo da incerteza da amostragem, através do cálculo da variância da amostragem, usando 2 ensaios e 2 duplicados. Adaptado do Guia RELACRE 28: Amostragem de águas (42).....	19
Tabela 4- Tabela de comparação das normas ISO 7218:2007 Amd 2013 e da ISO/TS 17728:2015 relativos a pontos de informação antes da colheita.....	20
Tabela 5- Tabela de comparação das normas ISO 7218:2007 Amd 2013 e da ISO/TS 17728:2015 relativos a pontos de informação relacionados com a colheita.....	24
Tabela 6- Tabela de comparação das normas ISO 7218:2007 Amd 2013 e da ISO/TS 17728:2015 relativos a pontos de informação após colheita.....	27
Tabela 7- Sumário das contagens de colónias em 1 amostra em duplicado (2 para carcaças) de cada matriz alimentar analisada.....	31
Tabela 8- Análise conjunta dos valores log ₁₀ dos duplicados das duas amostras de carcaças.	31
Tabela 9- Sumário das contagens de colónias e vários parâmetros estatísticos para zaragatoas em análise. São apresentados dois grupos de zaragatoas: zaragatoas amostradas de clientes (5 amostras) e zaragatoas contaminadas em laboratório (8 amostras).....	32
Tabela 10- - Análise conjunta dos valores log ₁₀ dos duplicados das amostras de zaragatoas sendo a) Conjunto das trezes zaragatoas e duplicados; b) conjunto das cinco zaragatoas amostradas em clientes e seus duplicados; c) conjunto das oito zaragatoas contaminadas em laboratório e seus duplicados.....	33
Tabela 11- Valores da incerteza da análise, amostragem e processo de amostragem e análise em conjunto para a matriz salsicha fresca.....	33
Tabela 12 - Valores da incerteza da análise, amostragem e processo de amostragem e análise em conjunto para a matriz coxinha de frango.....	34

Tabela 13 –Valores da incerteza da análise, amostragem e processo de amostragem e análise em conjunto para a matriz folhado misto.	34
Tabela 14 – Valores da incerteza da análise, amostragem e processo de amostragem e análise em conjunto para a matriz carcaças.	35
Tabela 15 – Valores da incerteza da análise, amostragem e processo de amostragem e análise em conjunto para a matriz higiene de superfícies (zaragatoa) com base na análise dos duplicados.	35
Tabela 18 – Sumário dos valores de incerteza da análise e amostragem obtidos pela análise de amplitudes de duplicados.	36
Tabela 16– Cálculo da variância da análise e, conseqüentemente, a incerteza relativa à análise com base na análise da ANOVA.	38
Tabela 17– – Cálculo da variância da amostragem e, conseqüentemente, a incerteza relativa à amostragem com base na análise da ANOVA.....	39
Tabela 19– Valores dos cálculos da incerteza para a matriz higiene de superfícies (zaragatoa) utilizando a análise das amplitudes dos duplicados ($A_{n_{dup}}$) e a análise da ANOVA ($A_{n_{ANOVA}}$).40	40

1. Instituição e Contextualização do estágio

1.1. Caracterização do laboratório do estágio

O estágio curricular decorreu durante dez meses no Laboratório EQUILIBRIUM Laboratório de Controlo de Qualidade e de Processos, Lda., empresa sediada no concelho de Matosinhos, constituída em 1994.

O objetivo desta empresa, com a sua equipa de técnicos especializados em diferentes áreas científicas, foca-se num serviço em matéria de assessoria, diagnóstico, proposição e medidas corretivas, controlo de gestão de substâncias químicas e bacterianas e controlo de qualidade em amostras de água, alimentos e higiene e superfícies.

O laboratório possui um sistema da qualidade implementado e encontra-se acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), segundo a Norma NP EN ISO/IEC 17025- Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração, apresentando o número L0312, datado de 27 de março de 2003. Este encontra-se acreditado para a recolha de amostras na Matriz Água: consumo humano, balneares, naturais, piscinas, processo e residuais; na Matriz Alimentos e Higiene de superfícies/Superfícies de Carcaças; na Matriz Produtos Cosméticos e na Matriz Atividades Médicas.

A empresa para o desenvolvimento do seu trabalho está equipada com um Laboratório de Físico-química e um Laboratório de Microbiologia e Toxicologia, dispondo também de uma Unidade Móvel para a colheita e conservação de amostras, sendo também composta por um Departamento de Assistência Técnica, onde são prestados serviços de apoio ao cliente (1).

1.2. Objetivo do estágio

O estágio realizou-se ao longo de seis meses, não consecutivos, tendo sido dividido entre o Departamento de Qualidade e o Laboratório de Microbiologia. O estágio baseou-se em dois objetivos determinados pelo laboratório. O primeiro objetivo do estágio, no Departamento de Qualidade, foi a realização do estudo comparativo entre duas normas em relação às colheitas das amostras para análise. As normas em estudo foram a norma que está neste momento implementada no laboratório, a ISO 7218:2007 Amendada 2013 (ISO 7218) com a norma que se mostrou de interesse para o laboratório, a ISO/TS 17728:2015 (ISO 17728). A finalidade destes estudo de comparação foi perceber se a ISO 17728 apresenta melhorias que sejam consideradas importantes em relação à norma ISO 7218 no que diz respeito à informação que fornece sobre as

colheitas das amostras para análise e se estas melhorias são justificáveis à implementação da norma ISO 17728 como complemento à já implementada.

O segundo objetivo definido para o estágio, já inserido no laboratório de Microbiologia, foi a realização do cálculo da incerteza da amostragem através da quantificação dos microrganismos, utilizando os métodos fornecidos pela Relacre, o cálculo com base na análise de amplitudes de duplicados (An_{dup}) e com base na análise ANOVA (An_{ANOVA}). A finalidade destes cálculos foi analisar os valores obtidos usando estes métodos e refletir se estes poderiam ser adaptados para contexto alimentar e ser utilizados no laboratório para o cálculo das incertezas das matrizes que este analisa por rotina.

2. Introdução

2.1. Doenças de origem alimentar e segurança alimentar

Ao longo dos últimos anos observou-se aumento da incidência de Doenças de Origem Alimentar (DOA). Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS), estimou que anualmente, cerca de 600 milhões de pessoas no mundo adoecem devido ao consumo de alimentos contaminados (2). Em 2018, 26 países reportaram ao Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC) cerca de 5146 surtos de toxinfecções alimentares provocadas pelo consumo de alimentos contaminados, que afetaram 48365 pessoas (Figura 1A e 1B). Nestes surtos, as espécies *Salmonella*, *Campylobacter* e *Norovirus* destacam-se como os principais agentes causais identificados (3) (Figura 1C).

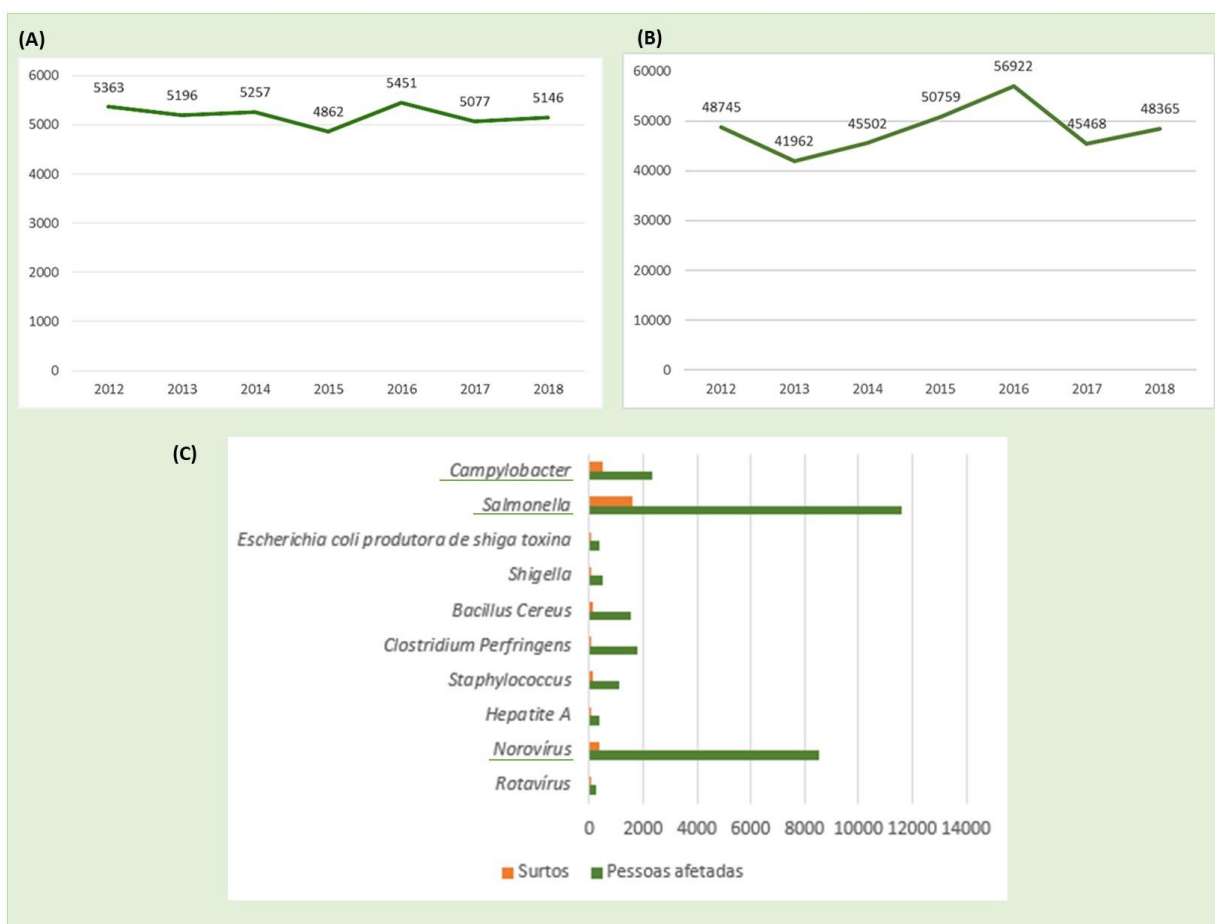


Figura 1- (A) Número de surtos de origem alimentar, reportados por países europeus ao ECDC durante o período 2012-2018; (B) Número de pessoas afetadas pelos surtos de origem alimentar, reportados por países europeus ao ECDC durante o período 2012-2018; (C) Enumeração dos 10 principais agentes identificados responsáveis por surtos alimentares reportados ao ECDC durante o ano de 2018. Foram selecionados os agentes que possíveis de serem identificados, tendo havido um grande número de surtos onde não foi possível identificar o agente responsável. Adaptado de EFSA et al. 2019.

Em Portugal, em 2018, foram reportados 11 surtos de toxinfecções alimentares provocadas pelo consumo de alimentos contaminados, que afetaram cerca de 759 pessoas (Figura 2) (3). A compilação de dados reportados em Portugal, entre os anos 2012–2018 indicam que apesar do número de surtos constante, o número de pessoas afetadas apresenta grande variações.

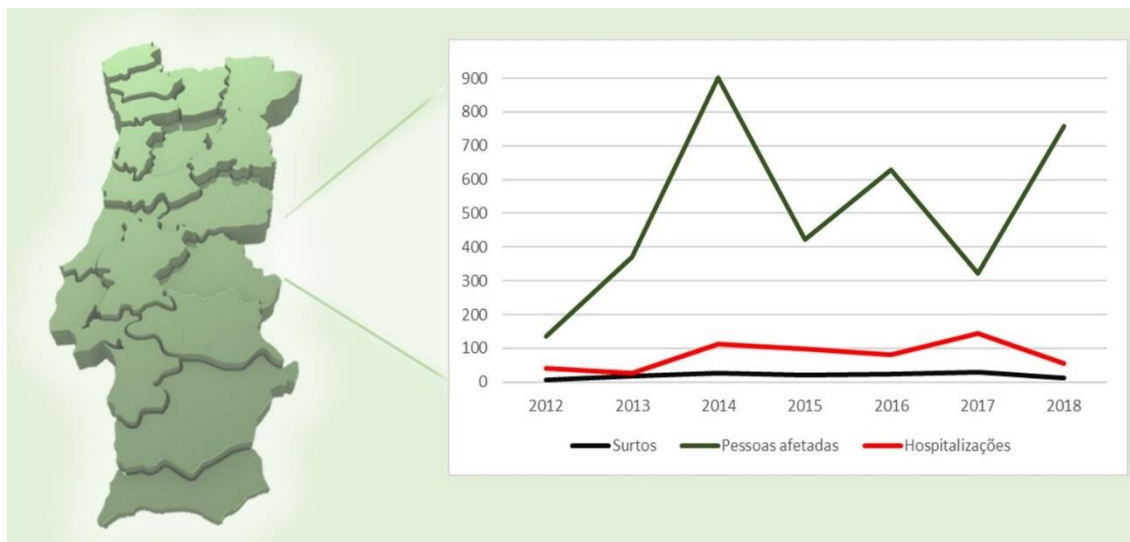


Figura 2- Número de surtos de origem alimentar, pessoas afetadas nesses surtos e consequentes hospitalizações em Portugal durante o período de 2012–2018. Dados provenientes dos relatórios anuais do ECDC durante os anos de 2012 a 2018.

Apesar dos dados reportados, expressos na Figura 1, estes valores poderão estar subavaliados já que apenas as pessoas sintomáticas, procuram serviços médico (4). De facto, a probabilidade de um caso de surto de origem alimentar ser reconhecido e notificado pelas autoridades depende de vários intervenientes, desde a participação dos consumidores até ao registo das autoridades médicas (5,6). Este número elevado de DOA é resultante de vários fatores, nomeadamente a alteração de hábitos alimentares, aumento da suscetibilidade da população, alteração das técnicas de preparação e distribuição de alimentos, mudanças no ambiente e nas características dos microrganismos, e aumento do comércio internacional (4,7,8).

Os alimentos constituem um veículo de transmissão de microrganismos patogénicos que podem ser introduzidos em qualquer ponto da cadeia de processamento (4). A transmissão pode ocorrer em produtos frescos, quer pelo uso de água contaminada aquando da sua lavagem, quer pelo défice do procedimento da cozedura (9). Durante e após o processamento dos alimentos existem também práticas de risco como a refrigeração insuficiente e o armazenamento inadequado, contaminação cruzada entre alimentos crus e cozinhados, e higienização insuficiente das instalações e dos manipuladores (10). Assim, é crucial, assegurar que ao longo da cadeia de processamento, desde o produtor até ao consumidor, os alimentos estejam livres de contaminação e próprios para consumo (7).

A segurança alimentar tornou-se importante no controlo de surtos. Esta prática tem como objetivo assegurar que no momento do consumo, os alimentos não sejam prejudiciais para a saúde pública,

através do cumprimento de regras e procedimentos adequados previamente estabelecidos por autoridades competentes (11,12). Atualmente, o controlo da qualidade e segurança alimentar é realizado, a nível nacional e europeu, pela indústria alimentar. Este controlo é assegurado desde a entrada dos alimentos na cadeia de produção até ao consumidor final, pela aplicação de legislação, normas e boas práticas de higiene (13).

Ao longo dos anos, foram desenvolvidas estratégias para reforçar a regulamentação neste domínio, a nível nacional e internacional. Em 1963, foi criada a Comissão do Codex Alimentarius, ou Codex, pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e pela OMS. O seu principal objetivo é desenvolver normas, diretrizes e códigos de prática internacionais em alimentos para a proteção da saúde dos consumidores e garantir práticas justas no comércio de alimentos (14). Estas normas, diretrizes e códigos, referidos como textos Codex, são recomendações, sendo a sua aplicação voluntária (15). No entanto, pelo facto de serem reconhecidas e aceites por muitos países, têm vantagens porque permitem uma maior harmonização na manutenção de elevados níveis de segurança e qualidade no comércio de produtos alimentares (7,16).

Ao longo dos últimos 20 anos, a UE criou uma série de regulamentos, com vista a reforçar a proteção da saúde humana através das autoridades oficiais e, de igual forma, dar a conhecer a todos os intervenientes da indústria alimentar os requisitos a que estão obrigados a cumprir (Figura 3).

Em 2002, foi publicado o regulamento (CE) Nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, conhecido como a Lei Geral de Alimentos que cria uma série de medidas sistematizadas na Figura 3 (17). Em 2004, vários regulamentos foram emanados que pretenderam criar regras de forma a responsabilizar os operadores de empresas do setor alimentar pela ausência de cumprimento da legislação alimentar (18–20). Em 2005, o Regulamento (CE) Nº 2073/2005 da Comissão estabelece critérios microbiológicos para determinar microrganismos, devendo os operadores das empresas do setor alimentar assegurar que os géneros alimentícios cumprem esses critérios para que o fornecimento, manuseamento e transformação da matéria-prima seja realizado de forma a respeitar os critérios de segurança dos géneros alimentícios aplicáveis durante toda a vida útil do produto (21). No entanto, estes regulamentos após a sua criação têm sido revistos, de forma a acompanharem a evolução técnico-científica. Em 2007, foi criado o Regulamento (CE) Nº

1441/2007, que veio alterar o Regulamento Nº 2073/2005, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios (22).

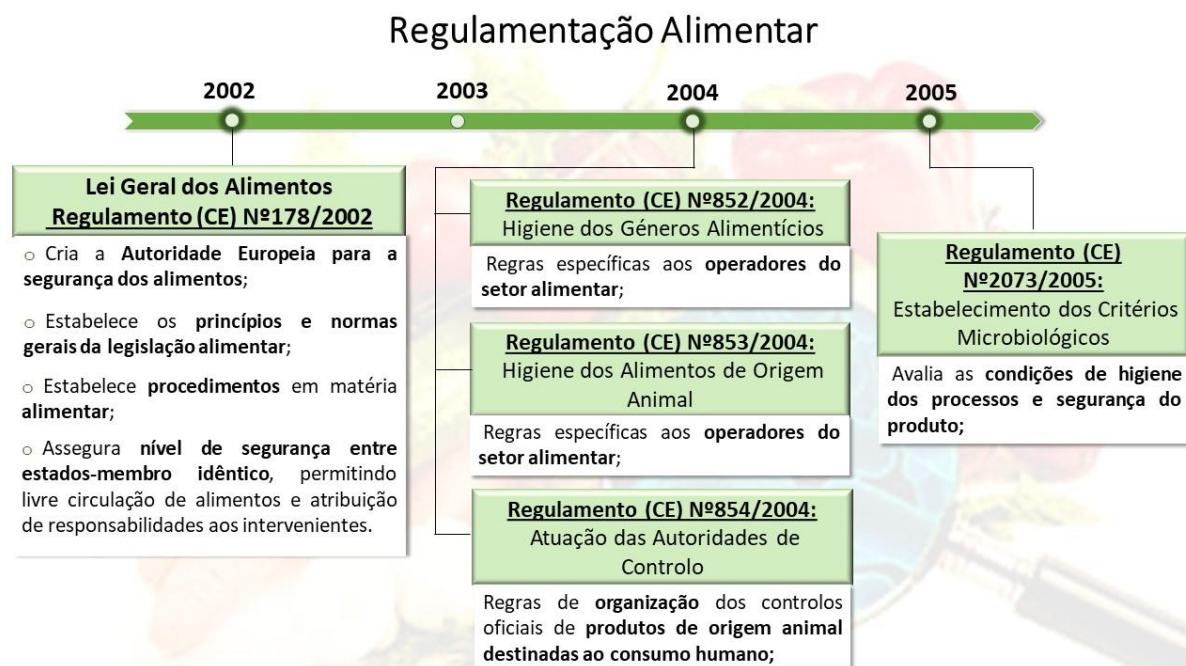


Figura 3 - Timeline de regulamentos criados pela União Europeia entre 2002 e 2005 para regulamentação alimentar. (12-16).

A segurança alimentar, num país, é controlada pela organização de controlo alimentar através de regulamentos, normas, regras e práticas (23). Desta forma, os laboratórios de microbiologia alimentar, responsáveis pelas análises de rotina para o cumprimento de legislação nacional, têm um papel importante quando se trata de assegurar a qualidade e a segurança dos alimentos (24,25). As análises realizadas pelos laboratórios são usadas tanto pelas autoridades de controlo como pelos operadores do setor alimentar para monitorização da qualidade que permita a deteção de riscos emergentes como, por exemplo, a presença de microrganismos patogénicos ou de toxinas que podem causar toxinfecções (24,26). Esta análise pode ainda dar indicações importantes sobre as condições de higiene em que o alimento foi preparado. A análise de produtos finais, permite rastrear e evitar a comercialização de produtos não conformes (27).

2.2. Organização Internacional de Padronização

No âmbito da segurança e qualidade alimentar, a pressão socioeconómica existente, tem vindo a impulsionar o surgimento de métodos padronizados, dos quais se destacam métodos da Organização Internacional de Padronização (ISO, do inglês *International Standardization Organization*), reconhecidos como métodos analíticos de referência de controlo oficial. Têm sido desenvolvidos com base em conhecimento de peritos da área de atuação do método e acordados em consenso internacional. São de "acesso aberto", no sentido em que a composição dos meios que

são utilizados é totalmente conhecida, as técnicas utilizadas são descritas com detalhe suficiente para serem reproduzidas e o material utilizado pode ser adquirido através de vários fornecedores (24). Estes métodos são ainda utilizados por muitos laboratórios, principalmente pelas agências de regulamentação, por serem métodos harmonizados. A utilização destes métodos tornam-se vantajosos pela facilidade de comparação de resultados, por não ser necessário a validação de métodos e através destes métodos há uma simplicidade da avaliação do laboratório por análise interlaboratorial. Por estes motivos, tornam-se uma norma padrão na análise alimentar (24).

No entanto, apesar de utilizarem estes métodos considerados padrão, os laboratórios têm de assegurar que atingem o nível de qualidade necessário, de forma a garantir resultados robustos e um desempenho similar ao que foi obtido aquando na validação do método (28). A acreditação do laboratório tem como objetivo garantir a competência técnica para a realização de um determinado ensaio ou calibração, promovendo a melhoria contínua dentro do próprio laboratório (29). Assim, o laboratório é reconhecido e acreditado pela qualidade apresentada no seu trabalho, obtendo numa vantagem competitiva perante os restantes laboratórios atuarem no mercado. A acreditação de laboratórios rege-se, a nível internacional e europeu, por normas harmonizadas que permitem o reconhecimento mútuo das acreditações entre estes, facilitando a livre circulação de bens e serviços abrangidos pela mesma (29–31).

Dito isto, os métodos ISO são criados por uma equipa de peritos, que perante a deteção de falhas no mercado, na indústria ou pelos grupos de consumidores, se reúnem para a criação de métodos consensuais. Esta equipa é representada pelo conjunto de profissionais que usarão estes métodos e serão consequentemente influenciados por estes (representantes da indústria, organizações governamentais e não-governamentais, pessoal académico, por exemplo) (32,33).

Os métodos ISO e a sua criação são um processo contínuo em constante desenvolvimento. Além da criação de novos métodos, ocorre a atualização dos existentes, sendo revistos quando necessário. Assim, é crítico que as organizações que usam estes métodos (ex: laboratórios) se encontrem atualizados, e é relevante para o laboratório fazer um estudo interno comparativo entre os métodos existentes para a área de interesse e verificar qual é o mais adequado estar implementado, satisfazendo os requisitos de qualidade e de segurança (33). Esta necessidade de comparação de métodos mostrou-se necessária no laboratório para a área das colheitas.

A norma neste momento implementada no laboratório para as colheitas de amostras, é um método interno, baseado na norma ISO 7218:2007 Amd 2013, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations* (Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal – Requisitos gerais e orientações para análises microbiológicas) (34). Trata-se de uma norma que, além de fornecer informação sobre os processos inerentes ao processo de amostragem e informações referentes às amostras, engloba os requisitos

gerais para boas práticas em laboratório e orientação para a acreditação como laboratório de microbiologia alimentar (35). Para o estudo comparativo, a norma ISO 17728: 2015, *Microbiology of the food chain- Sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples* (Microbiologia da cadeia alimentar-Técnicas de amostragem para análise microbiológica de alimentos e ração de animais), mostrou ser a norma de interesse. Trata-se de uma norma que contempla requisitos gerais e instruções para a obtenção de amostras assim como seu transporte para o laboratório (36).

A finalidade deste estudo será entender se o laboratório mantém os procedimentos atualizados e se a norma que está implementada continua a satisfazer os requisitos de qualidade, segurança e de obtenção de resultados que neste momento, com a divulgação da norma de interesse, se mostrou necessário obter.

2.3. Importância da amostra e da sua Incerteza

Um lote alimentar é sujeito a análise microbiológica previamente a ser disponibilizado para consumo. Esta é feita após a amostragem do lote, previamente acordada com o cliente. A amostra deve ser retirada de forma aleatória e ser representativa do lote, sendo avaliada segundo critérios microbiológicos (CM) definidos na lei ou em diretrizes da indústria para esse produto (37,38). Segundo o Codex, os CM definem a aceitação microbiológica de um lote baseada nos resultados da sua amostra e análise (39).

O principal objetivo dos resultados laboratoriais é servir de suporte à tomada de decisão. No entanto, há que considerar a incerteza associada a estes resultados uma vez que afetam a fiabilidade dos resultados (40-42). Todo o processo de análise da amostra, desde o desenho do plano de amostragem, passando pela medição da quantidade de amostra até à análise realizada em laboratório, contribuem para a incerteza do resultado (Figura 4). Sendo assim, para alguns autores, será fundamental ter em consideração esta incerteza (40,41).

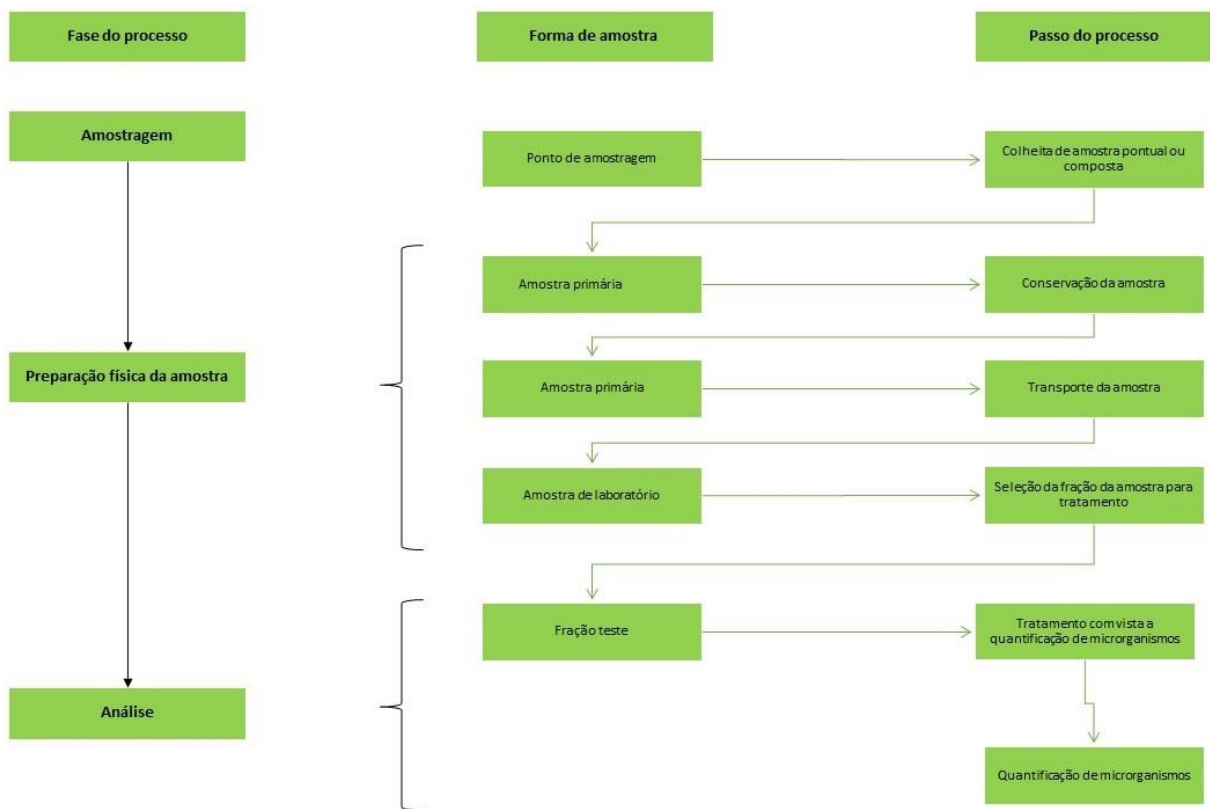


Figura 4 - Diagrama do processo analítico da quantificação de microrganismos, desde o ponto de amostragem até à quantificação. Adaptado de Nordest (2020)

A incerteza de medição é reconhecida como sendo importante em qualquer tipo de análise, sendo que esta abrange tanto a incerteza analítica como a incerteza da amostragem (40,43–45). Enquanto a importância da incerteza analítica já é largamente reconhecida em microbiologia, continua vigente uma lacuna em dados relativos à incerteza da amostragem (46–49). Esta ausência de dados resulta da negligência que tem sido atribuída à avaliação da extensão e potencial significado da distribuição dos microrganismos em relação à incerteza da amostragem (50–52). Podem existir várias fontes desencadeantes para a produção de grandes níveis de incerteza no processo de amostragem, quer pelas características da amostra em estudo, quer pelas características da amostragem (equipamentos e procedimentos utilizados para a obtenção da amostra, os técnicos que realizam a amostragem e sua experiência na execução das técnicas de amostragem, as condições de acondicionamento da amostra e seu transporte), entre outras fontes que poderão afetar significativamente os resultados (Figura 5). Sendo assim, a incerteza da amostragem poder ser definida como a variabilidade entre e dentro das amostras, devido à distribuição heterogênea do analito (no caso das análises microbiológicas, dos microrganismos), por isso, podem ser observadas diferenças consideráveis em amostras duplicadas retiradas do mesmo lote (52).

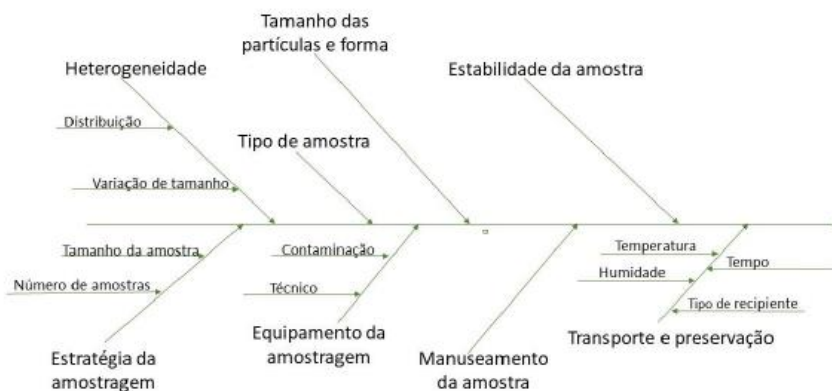


Figura 5 – Diagrama de causa-efeito de possíveis fontes que contribuem para a incerteza. Adaptado de Gron et al. (2007).

No entanto, esta distribuição dos microrganismos não é considerada na estimativa da incerteza de medição. Isto acontece por esta ser feita com base na preparação da suspensão inicial da porção teste e da qual são realizadas uma série de diluições (53).

Durante a preparação da amostra para análise, a distribuição "natural" é perturbada, resultando numa mistura de células individuais, pares, agregados, aglomerados e cadeias de organismos, de tal forma que os resultados obtidos podem indicar uma distribuição aleatória (54). Por outras palavras, a natureza absoluta da distribuição das populações de microrganismos nas análises microbiológicas será camuflada pelos efeitos da amostragem e dos procedimentos utilizados para obter o resultado analítico (53).

A contagem de colónias obtida após a quebra espacial da distribuição dos organismos normalmente segue uma distribuição normal logarítmica, embora distribuições mais complexas possam ocorrer (55–58).

Investigações na composição química dos alimentos já demonstraram que a incerteza da amostragem é no mínimo tão grande, se não maior, quanto a incerteza da medição estimada (59–61). Este pressuposto já foi demonstrado para a análise microbiológica dos alimentos (49,62). Estas investigações demonstram que a incerteza da medição de um exame microbiológico às amostras de alimentos subestima a extensão da distribuição heterogénea dos microrganismos, e a sua dispersão dentro de um lote (53). Dito isto, torna-se essencial ao laboratório dispor de uma forma de cálculo ou de um método que permita obter uma noção do peso da amostragem e da sua incerteza no resultado obtido.

A Relacre, para a amostragem de águas, fornece um guia baseado nos guias EURACHEM e da Nordtest, Guia da RELACRE 28: Amostragem de águas (42). No entanto, a realização deste teste para análise de alimentos não poderá ser efectuado com o mesmo número de amostras que são utilizadas para a análise das águas. Isto sucede, pelo facto, de que se fosse realizado o mesmo número e tendo em conta que seria necessário realizar para cada matriz alimentar, chegaria a um

número de testes que seria inconcebível, devido ao número de duplicados e a série de diluições necessárias (52). Tendo em conta estes pressupostos, o laboratório poderá efetuar o teste para os produtos alimentares e adaptando-o à realidade do laboratório de forma a obter uma informação relativa à incerteza da amostragem.

3. Material e métodos

3.1. Comparação da norma ISO 7218:2007 Amenda 2013 com a norma da ISO/TS 17728:2015.

No decorrer do estudo comparativo, foi inicialmente realizada a leitura de cada uma das normas de interesse, a ISO 7218 e a ISO 17728. De seguida, foi realizada a análise de todos os pontos abordados em cada norma e anotado quais destes eram ou não diretamente comparáveis, tendo sido sistematizadas as semelhanças e diferenças entre as normas.

3.2. Protocolo experimental para o cálculo das incertezas

3.2.1. Amostras alimentares e método escolhido

As amostras alimentares escolhidas para a análise teve como objetivo obter valores para matrizes que já eram analisadas pelo laboratório em rotina. Sendo assim, foram analisadas: quatro matrizes alimentares (coxinha de frango, carne picada, salsicha fresca, folhado misto) tendo sido analisada uma amostra para cada matriz; uma matriz de higiene de superfícies de carcaças tendo sido analisada duas amostras para esta matriz, sendo cada amostra composta por cinco esponjas; uma matriz higiene de superfícies tendo sido analisada um total de treze zaragatoas (sendo que destas, oito foram contaminadas em ambiente laboratorial). A quantificação de microrganismos a 30 °C foi realizado segundo a ISO 4833-1:2013, tendo o procedimento sido realizado separadamente para cada matriz (63),

3.2.2. Preparação das amostras

O protocolo geral (Figura 6) foi utilizado para todos os alimentos segundo o método ISO 4833-1:2013 (63). Foi retirado da amostra 10 gramas assepticamente para um saco de stomacher esterilizado. Após adicionar 90 mL de diluente (água peptonada, BioMarkDiagnostics BK084) e o saco foi colocado no stomacher durante 1 minuto para obter diluição 1 para 2 da subamostra (suspensão-mãe). Este procedimento foi repetido para uma segunda subamostra de 10 gramas. Após a realização da suspensão-mãe, foram realizadas diluições decimais em duplicado. A partir da diluição-mãe, mediu-se 1 mL para um tubo que continha o diluente esterilizado (9 mL) para uma

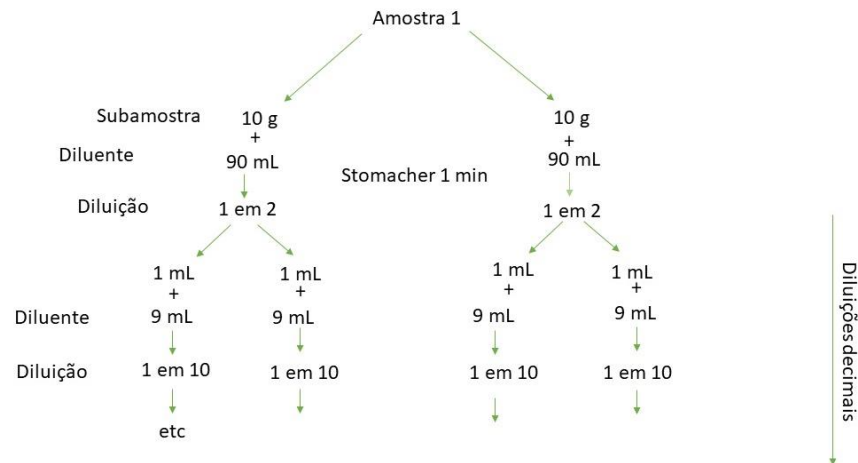


Figura 6 – Esquema do protocolo geral utilizado para a realização de diluições para análise dos alimentos por contagem de colónias.

obter uma diluição de 1 para 10, vortexando o tubo de seguida. O processo seguiu-se até obter as diluições necessárias até ser obtido pelo menos duas diluições seguidas em placas que sejam contáveis (máximo 300 colónias). Para o caso das matrizes alimentares, para a coxinha foi realizada diluição até 10^{-3} , para salsicha fresca 10^{-4} , para carne picada 10^{-5} , folhado misto 10^{-6} . De cada diluição é retirado 1 mL e colocado em placa de Petri de 90 mm de diâmetro, de seguida adicionou-se 15 mL do meio de cultura Plate Count Agar (PCA).

Para a matriz esponja foram usadas 5 esponjas, sendo estas divididas em 2 esponjas para um saco de stomacher e 3 em outro saco, seguindo os restantes passos do protocolo, tendo sido realizada diluições até 10^{-6} .

Para as zaragoas, foi realizado o mesmo método (ISO 4833-1:2013). A homogeneização da zaragoa foi realizada em vortex ou manualmente. Foram realizadas as diluições decimais que se mostraram necessárias, no caso das zaragoas, até 10^{-1} .

3.2.3. Meios e condições de incubação

Após a inoculação das diluições em meio PCA (Plate Count Agar, BioMarkDiagnostics BK144), as placas foram incubadas invertidas a 30°C durante 3 dias.

3.3. Contagem de unidades formadoras de colónias

Após a incubação das placas, procedeu-se à contagem manual das colónias. Após a contagem em todas as placas, foi realizado o cálculo da contagem das unidades formadoras de colónias (N) através da Equação 1 (64). Para a realização deste cálculo é realizada a média ponderada a partir de placas de duas diluições sucessivas que não contenham mais de 300 colónias cada. O valor é apresentado em unidades formadoras de colónias por grama de alimento (UFC/g).

$$N = \left[\frac{\sum C}{(n1+0,1n2)xd} \right] \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

$\sum C$ - Soma das colónias contadas nas duas placas consideradas;

$n1$ - Número de placas consideradas na primeira diluição;

$n2$ - Número de placas consideradas na segunda diluição;

d - Fator de diluição correspondente à primeira diluição considerada;

Para o caso das zaragatoas a contagem de colónias por cm^2 (N_s) é calculada através da equação 2:

$$N_s = \frac{N \times F}{A} \times d \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

N - ufc por mL

F -quantidade em mL de diluente no tubo

A -área de superfície a ser avaliada em cm^2

d -diluição considerada

3.4. Cálculo de Incertezas

O cálculo das incertezas foi realizado segundo dois métodos de cálculo presentes no guia do Relacre 28: Amostragem de águas. cálculo com base na análise de amplitudes de duplicados (An_{dup}) e com base na análise ANOVA (An_{ANOVA}). O cálculo da An_{dup} permite determinar os valor da incerteza relativa à colheita, análise separadamente mas de igual forma, permite determinar também à incerteza relativa ao processo análise e colheita ao mesmo tempo (42). O cálculo da An_{ANOVA} permite uma análise das variâncias dos valores em análise, sendo que a fonte de variação dos valores considerada será a variância entre análise e entre amostras (41). Foi realizada a análise usando estas duas perspetivas, sendo que o cálculo da An_{dup} foi realizado para todas as matrizes em estudo, separadamente, enquanto o cálculo da An_{ANOVA} foi realizado só para zaragatoas.

3.4.1. Análise de amplitudes de duplicados

Após o cálculo das UFC para cada ensaio realizado para cada matriz, estes valores foram anotados para cada matriz, para cada ensaio (P_1 e P_2), e para cada conjunto de subamostras e seus duplicados (P_{11} , P_{12} , P_{21} , P_{22}). Foram realizados os cálculos separadamente para cada matriz.

É realizado o cálculo da diferença em módulo para cada conjunto de duplicados, através da Equação 3:

$$D_{i1} = |P_{i11} - P_{i12}| \quad (\text{Equação 3})$$

A média dos valores das UFC foi calculado igualmente para cada conjunto de duplicados através da Equação 4:

$$\bar{x}_{i1} = \frac{P_{i11} + P_{i12}}{2} \quad (\text{Equação 4})$$

Após estes cálculos, é realizado o somatório de todos os resultados do cálculo da diferença em módulo, D_i , para cada ensaio, sendo feita a divisão pelo número de amostras existentes, segundo a Equação 5:

$$\bar{D}_i = \frac{\sum D_i}{n} \quad (\text{Equação 5})$$

A diferença em módulo dos dois ensaios, é feito através do cálculo da diferença em módulo das médias do conjunto de duplicados de cada amostra, através da equação 6:

$$D_n = |\bar{X}_{n1} - \bar{X}_{n2}| \quad (\text{Equação 6})$$

O somatório dos valores obtidos através da Equação 5, divididos pelo número de amostras, irá fornecer a média das medições, $\bar{D}_{\text{Amostragem} + \text{Análise}}$, através da Equação 7:

$$\bar{D}_{Am+An} = \frac{\sum D_n}{n} \quad (\text{Equação 7})$$

A média dos valores da análise, será obtido através da Equação 8, através da média dos valores de \bar{D}_i dos dois ensaios:

$$\bar{D}_{\text{Análise}} = \frac{\bar{D}_{i1} + \bar{D}_{i2}}{2} \quad (\text{Equação 8})$$

O desvio-padrão da análise, $DP_{\text{análise}}$, é calculado através da divisão da média dos valores da análise por 1,128:

$$DP_{\text{análise}} = \frac{\bar{D}_{\text{Análise}}}{1,128} \quad (\text{Equação 9})$$

O desvio-padrão relativo da análise $DPR_{\text{Análise}} (\%)$, é calculado através da divisão do desvio-padrão, pela média dos valores todos obtidos, sendo este resultado multiplicado por 100:

$$DPR_{\text{Análise}} (\%) = \frac{S_{\text{Análise}}}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Equação 10})$$

O desvio-padrão das medições baseados na análise dos duplicados $S_{Amostragem+Análise}$, é calculado através da divisão das médias das medições por 1,128;

$$DP_{Amostragem+Análise} = \frac{\bar{D}_{Amostragem+Análise}}{1,128} \quad (\text{Equação 11})$$

O desvio-padrão da amostragem é calculado através:

$$DP_{amostragem} = \sqrt{DP_{Amostragem+Análise}^2 - \left(\frac{DP_{Análise}}{\sqrt{2}}\right)^2} \quad (\text{Equação 12})$$

O desvio-padrão relativo da amostragem $DPR_{Amostragem}(\%)$, é calculado através da divisão do desvio-padrão, pela média dos valores todos obtidos, \bar{x} , sendo este resultado multiplicado por 100:

$$DPR_{Amostragem}(\%) = \frac{DP_{Amostragem}}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 13})$$

Todos estes cálculos podem ser agrupados, estando sistematizados na Tabela 1.

Tabela 1- Cálculo da incerteza de amostragem com base na análise de amplitudes de duplicados. Adaptado do Guia da RELACRE (42)

Nº Amostra	Ensaio 1				Ensaio 2				
	P _{i11}	P _{i12}	D _{i1} = P _{i11} - P _{i12}	\bar{X}_{i1}	P _{i21}	P _{i22}	D _{i2} = P _{i21} - P _{i22}	\bar{X}_{i2}	D _i = \bar{X}_{i1} - \bar{X}_{i2}
1	P ₁₁₁	P ₁₁₂	D ₁₁ = P ₁₁₁ - P ₁₁₂	\bar{X}_{11}	P ₁₂₁	P ₁₂₂	D ₁₂ = P ₁₂₁ - P ₁₂₂	\bar{X}_{12}	D ₁ = \bar{X}_{11} - \bar{X}_{12}
2	P ₂₁₁	P ₂₁₂	D ₂₁ = P ₂₁₁ - P ₂₁₂	\bar{X}_{21}	P ₂₂₁	P ₂₂₂	D ₂₂ = P ₂₂₁ - P ₂₂₂	\bar{X}_{22}	D ₂ = \bar{X}_{21} - \bar{X}_{22}
3	P ₃₁₁	P ₃₁₂	D ₃₁ = P ₃₁₁ - P ₃₁₂	\bar{X}_{31}	P ₃₂₁	P ₃₂₂	D ₃₂ = P ₃₂₁ - P ₃₂₂	\bar{X}_{32}	D ₃ = \bar{X}_{31} - \bar{X}_{32}
...									
n	P _{n11}	P _{n12}	D _{n1} = P _{n11} - P _{n12}	\bar{X}_{n1}	P _{n21}	P _{n22}	D _{n2} = P _{n21} - P _{n22}	\bar{X}_{n2}	D _n = \bar{X}_{n1} - \bar{X}_{n2}
			$\bar{D}_{i1} = \frac{\sum D_{i1}}{n}$				$\bar{D}_{i2} = \frac{\sum D_{i2}}{n}$		$\bar{D}_{\text{Amostragem} + \text{Análise}} = \frac{\sum D_i}{n}$
Análise							$DP_{\text{Análise}} = \frac{\bar{D}_{\text{Análise}}}{1,128}$		
	$\bar{D}_{\text{Análise}} = \frac{\bar{D}_{i1} + \bar{D}_{i2}}{2}$						$DPR_{\text{Análise}} (\%) = \frac{DP_{\text{Análise}}}{\bar{X}} \times 100$		
Análise + Amostragem	$\bar{D}_{\text{Amostragem} + \text{Análise}} = \frac{\sum D_i}{n}$						$DP_{\text{Amostragem} + \text{Análise}} = \frac{\bar{D}_{\text{Amostragem} + \text{Análise}}}{1,128}$		
Amostragem	$DP_{\text{amostragem}} = \sqrt{DP_{\text{Amostragem} + \text{Análise}}^2 - \left(\frac{DP_{\text{Análise}}}{\sqrt{2}}\right)^2}$								
	$DPR_{\text{Amostragem}} = \frac{DP_{\text{amostragem}}}{\bar{X}} \times 100$								

3.4.2. Análise ANOVA

Tal como na análise anterior, os valores utilizados serão os obtidos após o cálculo das UFC. Esta análise é dividida em duas partes: cálculo da variância da análise e cálculo da variância da amostragem.

3.4.2.1 Cálculo variância da análise

Começando pelo cálculo da variância da análise, o primeiro cálculo a realizar após obter os valores de UFC, será calcular a média dos valores para cada conjunto de duplicados:

$$\bar{x}_{i1} = \frac{P_{i11} + P_{i12}}{2} \quad (\text{Equação 3})$$

Para cada conjunto de duplicados, é calculado a diferença ao quadrado, $D_{i1(\bar{x})}^2$ entre cada duplicado e a média dos valores:

$$D_{i1(\bar{x})}^2 = |P_{i11} - \bar{X}_{i1}|^2 \quad (\text{Equação 14})$$

Os valores de $D_{i1(\bar{x})}^2$ de cada conjunto de duplicados são somados:

$$2D_{i1(\bar{x})}^2 = D_{i1(\bar{x})}^2 + D_{i1(\bar{x})}^2 \quad (\text{Equação 15})$$

A soma dos quadrados dentro dos grupos (neste caso, amostras), $SQ_{Análise}$ é calculado através da soma de todos $D_{i1(\bar{x})}^2$ de todas as amostras:

$$SQ_{Análise} = 2 \sum_{i=1}^n [D_{i1(\bar{x})}^2 + D_{i2(\bar{x})}^2] \quad (\text{Equação 16})$$

Os graus de liberdade, $gl_{Análise}$, são calculados através:

$$gl_{Análise} = i \cdot j \cdot k - i \cdot j \quad (\text{Equação 17})$$

Em que:

i - Número de amostras em análise;

j - Número de subamostras analisadas por ensaio;

k - Número de duplicados analisados por ensaio;

A variância da análise, $Variância_{Análise}$, é calculada da seguinte forma:

$$Variância_{Análise} = \frac{SQ_{Análise}}{gl_{Análise}} \quad (\text{Equação 18})$$

O desvio-padrão, $DP_{Análise}$, e desvio-padrão relativo, $DPR_{Análise}(\%)$ são calculados:

$$DP_{Análise} = \sqrt{Variância_{Análise}} \quad (\text{Equação 19})$$

$$DPR_{Análise}(\%) = \frac{DP_{Análise}}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 20})$$

Em que:

\bar{x} - média dos valores obtidos de todas as amostras;

Na tabela 2, apresenta-se todos os cálculos agrupados para o cálculo da variância da análise, levando conseqüentemente, ao cálculo da incerteza da análise.

Tabela 2- Cálculos necessários, através da Análise ANOVA para o cálculo da incerteza da análise, através do cálculo da variância da análise, usando 2 ensaios e 2 duplicados. Adaptado do Guia RELACRE 28: Amostragem de águas (42).

	P ₁₁	P ₁₂	P ₂₁	P ₂₂	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂
1	X _{i11}	X _{i12}	X _{i21}	X _{i22}	\bar{X}_{i1}	\bar{X}_{i2}	$2D_{i1(\bar{x})}^2$	$2D_{i2(\bar{x})}^2$
2	X _{i11}	X _{i12}	X _{i21}	X _{i22}	\bar{X}_{i1}	\bar{X}_{i2}	$2D_{i1(\bar{x})}^2$	$2D_{i2(\bar{x})}^2$
(...)								
n	X _{n11}	X _{n12}	X _{n21}	X _{n22}	\bar{X}_{n1}	\bar{X}_{n2}	$2D_{n1(\bar{x})}^2$	$2D_{n2(\bar{x})}^2$
\bar{x}					$SQ_{Análise} = 2 \sum_{i=1}^n [D_{i1(\bar{x})}^2 + D_{i2(\bar{x})}^2]$			
$gl_{Análise} = i.j.k - i.j$					$Variância_{Análise} = \frac{SQ_{Análise}}{gl_{Análise}}$			
$DP_{Análise} = \sqrt{Variância_{Análise}}$					$DPR_{Análise}(\%) = \frac{DP_{Análise}}{\bar{x}} \times 100$			

3.4.2.2 Cálculo variância amostragem

Após os anteriores resultados, é estimado a variância da amostragem. O valor médio para cada amostra é calculada:

$$\bar{X}_i = \frac{\bar{X}_{i1} + \bar{X}_{i2}}{2} \quad (\text{Equação 21})$$

O quadrado das diferenças entre o valor médio da amostra e o valor médio de cada ensaio é calculado de acordo:

$$(D_{i\bar{x}})^2 = (\bar{X}_i - \bar{x}_{i1})^2 = (\bar{X}_i - \bar{x}_{i2})^2 \quad (\text{Equação 22})$$

O somatório dos quadrados dos valores obtidos, $SQ_{Amostragem}$, é calculado de acordo:

$$SQ_{Amostragem} = 4 \times \sum_{i=1}^n D_{i(\bar{x})}^2 \quad (\text{Equação 23})$$

Os graus de liberdade, $gl_{Amostragem}$, são calculados da seguinte forma:

$$gl_{Amostragem} = i.j - i \quad (\text{Equação 24})$$

Em que:

i - Número de amostras em análise;

j - Número de subamostras analisadas por ensaio;

A variância da amostragem, $Variância_{Amostragem}$, é calculada da seguinte forma:

$$Variância_{Amostragem} = \frac{\frac{SQ_{Amostragem}}{gl_{Amostragem}} - \frac{SQ_{Análise}}{gl_{Análise}}}{2} \quad (\text{Equação 25})$$

O desvio-padrão, $DP_{Amostragem}$, e desvio-padrão relativo, $DPR_{Amostragem} (\%)$ são calculados:

$$DP_{Amostragem} = \sqrt{Variância_{Amostragem}} \quad (\text{Equação 26})$$

$$DPR_{Amostragem} (\%) = \frac{DP_{Amostragem}}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 27})$$

Em que:

\bar{x} - média dos valores obtidos de todas as amostras

Na tabela 3, apresentam-se todos os cálculos agrupados para o cálculo da variância da amostragem levando, conseqüentemente, ao cálculo da incerteza da amostragem.

Tabela 3 - Cálculos necessários, através da Análise ANOVA para o cálculo da incerteza da amostragem, através do cálculo da variância da amostragem, usando 2 ensaios e 2 duplicados. Adaptado do Guia RELACRE 28: Amostragem de águas (42)

	P ₁₁	P ₁₂	P ₂₁	P ₂₂	P ₁	P ₂		
1	X ₁₁₁	X ₁₁₂	X ₁₂₁	X ₁₂₂	\bar{X}_{11}	\bar{X}_{12}	\bar{X}_1	$D^2_{1(\bar{x})}$
2	X ₂₁₁	X ₂₁₂	X ₂₂₁	X ₂₂₂	\bar{X}_{21}	\bar{X}_{22}	\bar{X}_2	$D^2_{2(\bar{x})}$
(...)								
n	X _{n11}	X _{n12}	X _{n21}	X _{n22}	\bar{X}_{n1}	\bar{X}_{n2}	\bar{X}_n	$D^2_{n(\bar{x})}$
\bar{x}					$SQ_{Amostragem} = 4 \times \sum_{i=1}^n D^2_{i(\bar{x})}$			
$gl_{Amostragem} = i.j - i$					$Variância_{Amostragem} = \frac{\frac{SQ_{Amostragem}}{gl_{Amostragem}} - \frac{SQ_{Análise}}{gl_{Análise}}}{2}$			
$DP_{Amostragem} = \sqrt{Variância_{Amostragem}}$					$DPR_{Amostragem} (\%) = \frac{DP_{Amostragem}}{\bar{x}} \times 100$			

3.5. Análise estatística

A contagens de colónias de cada matriz foram convertidas em log₁₀ antes de qualquer análise estatística.

Foi realizado o teste de *Kruskall-Wallis* (IBM SPSS Statistics) para o estudo de diferenças significativas entre as amostras para as matrizes carcaças e zaragatoas.

Outros parâmetros estatísticos (média, mediana, variância e desvio-padrão) foram determinados para cada matriz e para cada conjunto de duplicados.

4. Resultados e discussão

4.1. Comparação das norma

Após a revisão das normas, a informação relativa às convergências e divergências foi sistematizada numa tabela (Anexo 1). De forma a facilitar a interpretação, a comparação foi dividida em três tabelas, estando nelas presentes as principais diferenças encontradas entre as duas normas, de forma a ser facilitada a interpretação das possíveis melhorias que poderiam ser implementadas com a norma ISO 17728.

A distribuição da informação foi feita da seguinte forma:

- Pré-colheita: Todos os pontos relacionados com o que é feito antes da amostragem e enquadramento introdutório das duas normas (Tabela 4);
- Colheita: Todos os procedimentos relacionados com a amostragem ou realizados durante esta (Tabela 5);
- Pós-colheita: Todos os processos envolvidos após a amostragem (Tabela 6).

Na Tabela 4, estão presentes os pontos das duas normas da chamada Fase pré-colheita.

Tabela 4- Tabela de comparação das normas ISO 7218:2007 Amd 2013 e da ISO/TS 17728:2015 relativos a pontos de informação antes da colheita.

Principais diferenças: Fase pré-colheita	
ISO 7218:2007 Amd 2013	ISO/TS 17728:2015
Âmbito/Enquadramento	
<u>Referido no capítulo 1.</u> Fornecimento de guias e requisitos de boas práticas para laboratórios de microbiologia alimentar.	<u>Referido no capítulo 1.</u> Fornecimento de instruções gerais e requisitos para obtenção de amostras e seu transporte para o laboratório.
Referências Normativas	
<u>Referido no capítulo 2.</u> As seguintes ISO (ISO 835, ISO 6887, ISO 8199, ISO 8655, ISO 11133, ISO 16140-2, ISO 19036, ISO 22174) são, num todo ou em parte, referenciadas e indispensáveis à aplicação da atual norma.	<u>Referido no capítulo 2.</u> A anterior norma torna-se a base e, a única referência normativa.
Termos e definições	
<u>Não mencionado.</u>	<u>Referido no capítulo 3.</u>

	Definições dos termos usados ao longo da norma, categorizados em amostragem, amostras, produtos, manuseamento.
Princípios e requisitos gerais	
<u>Referido maioritariamente no ponto 8.1.1.</u>	<u>Referido no capítulo 4.</u> Importância do acordo mútuo entre laboratório e o cliente, nomeadamente, detalhes e cuidados a ter durante o processo de amostragem até ao momento da receção.
Pessoal	
<u>Referido no ponto 4.</u> Definidos critérios de avaliação, competências e suas verificações contínuas.	<u>Referido no capítulo 6.</u> Reforçada a importância de profissionais treinados e experientes para a realização da amostragem.
Preparação do material de laboratório	
<u>Referido no capítulo 6.</u> Importância da limpeza e esterilização do material de laboratório.	<u>Referido no ponto 7.1.1.</u> Menção ao material que deverá ser utilizado para a descontaminação dos materiais utilizados na amostragem e amostras.

4.1.1. Âmbito/Enquadramento

Presente no capítulo 1, a atual norma implementada, ISO 7218, além dos objetivos já acima referidos, fornece os principais requisitos e guia para outros três objetivos: a implementação de normas dos grupos ISO/TC 34/SC 9 ou do ISO/TC 34/SC 5 para deteção ou enumeração de microrganismos; as boas práticas laboratoriais para laboratórios de microbiologia alimentar; e um guia para a acreditação, como laboratório de microbiologia alimentar. O objetivo desta norma é assegurar a validação das análises microbiológicas realizadas aos alimentos, garantindo que as técnicas utilizadas para estas análises são, no seu geral, as mesmas usadas em diferentes laboratórios, contribuindo para a obtenção de resultados homogéneos e replicáveis entre eles. Outro objetivo é contribuir para a segurança do pessoal no laboratório, prevenindo risco de infeção. Além destes objetivos, esta norma cobre as análises a bactérias, leveduras e bolores e pode ser usada para príões, parasitas e vírus, se complementada com orientações específicas. A norma aplica-se à microbiologia dos alimentos para consumo humano e animal, do ambiente de produção primária e alimentar.

Na norma de interesse, ISO 17728, a informação presente no capítulo 1 é dirigida somente para a amostragem, transporte e receção das amostras em laboratório. Os requisitos gerais e instruções para a obtenção das amostras assim como para o seu transporte para o laboratório estão contemplados na norma. Aplica-se a todos os produtos alimentares e de alimentação animal, estando incluídos neste grupo produtos congelados, carcaças (excluindo as suas superfícies), carne e produtos *bulk* (produtos a granel). Os grupos de alimentos que estão excluídos desta norma estão

discriminados, não podendo ser realizada a sua colheita com base na mesma, sendo, no entanto, fornecida informação acerca da norma alternativa à qual se deve recorrer (Anexo 1).

Há uma diferença identificada entre ambas as normas no seu âmbito, sendo que a ISO 17728 verifica-se mais específica nas áreas em que esta poderá ser aplicada, neste caso, os alimentos que poderão ser amostrados por ela. Esta mesma especificidade contrasta com a generalização da utilização da norma atual, a ISO 7218.

A especificidade da ISO 17728 neste ponto, leva a uma redução das potenciais áreas de atuação. Esta especificidade da norma não apresenta vantagens devido à ISO 7218 ser já tão abrangente que já inclui as áreas que são abrangidas pela norma em estudo.

4.1.2. Referências normativas

Referido no capítulo 2 – Referências Normativas, são listadas todas as normas pelas quais a atual (ISO 7218) se rege (Tabela 1), estando estas completas no Anexo 1.

A nova norma (ISO 17728), rege-se só por uma norma, a atualmente utilizada (ISO 7218).

4.1.3. Termos e definições

Trata-se um ponto novo, estando presente apenas na nova norma (ISO 17728), no capítulo 3 – Termos e definições, onde são enumerados todos os termos utilizados ao longo da norma, bem como a sua definição respetiva. Alguns termos mencionados, já se encontram presentes nas normas ISO 7002:1986, *Agricultural food products– Layout for a standard method of sampling from a lot*, ISO 6887 e na que está atualmente implementada, ISO 7218:2007 Amd 2013.

De forma a facilitar a compreensão, os termos foram categorizados em quatro tópicos: amostragem, amostra, produtos e manuseamento de amostras.

Este novo capítulo tem como objetivo um alargamento do conhecimento do leitor na área de amostragem. A informação adicionada introduz detalhe de informação, logo na introdução do tema, fornecendo as ferramentas necessárias para uma melhor perceção e compreensão.

4.1.4. Princípios e requisitos gerais

Esta secção é a que apresenta mais similaridades de informação entre as duas normas (Tabela 1). Na norma atual (ISO 7218), esta informação encontra-se de forma mais generalizada, estando distribuída por vários pontos, mas estando maioritariamente presente no ponto 8.1.1. A semelhança de informação entre as duas normas em estudo é a informação que se encontra presente na atual norma implementada, tratando-se de informação base sobre o manuseamento das amostras, da importância de preservar a integridade destas, desde a sua colheita até à sua receção, passando

pelo transporte e manuseamento. Outra informação relevante e comum a ambas as normas é a importância de a amostra colhida ser representativa do lote ou produto e a sua documentação permitir a rastreabilidade da amostra durante a sua análise no laboratório.

A nova norma (ISO 17728) apresenta esta informação compactada num único capítulo, capítulo 4 – Princípios e requisitos gerais, estando a informação mais detalhada. Antes da amostragem, alguns parâmetros devem ser estipulados com o cliente: a quantidade mínima requerida para análise, instruções sobre a montagem no local de amostragem, a finalidade da análise, o tipo de produto e lotes a amostrar e os procedimentos e material que o pessoal da amostragem usará para a realização da amostragem, incluindo a roupa de proteção. Comparativamente à norma atual, alguma informação mais detalhada relativamente ao congelamento das amostras é adicionada nesta norma. Na ISO 7218, este congelamento não era permitido se as amostras antes da amostragem não estivessem já congeladas, devido a possibilidade de afetar a flora intrínseca microbiana da amostra e influenciar os resultados analíticos. Na norma 17728, esta informação volta a ser referida, sendo adicionada uma exceção no caso de o tempo de transporte ser prolongado ou a temperatura ser demasiado alta, sendo esta possibilidade previamente discutida com o cliente.

A informação relevante e do mesmo tópico, ao ser toda compactada num só capítulo, torna mais fácil a sua interpretação.

4.1.5. Pessoal

Presente no capítulo 4 – Pessoal, na atual norma em aplicação (ISO 7218), a informação aplica-se a todo o pessoal presente em laboratório, sendo indicado a norma ISO/IEC 17025 para os requisitos gerais de competência. As competências do pessoal devem ser avaliadas regularmente segundo parâmetros objetivos, sendo a avaliação realizada por vários métodos como a participação em programas de controlo de qualidade interna, uso de material de referência ou teste de autoavaliação para enumeração de microrganismos, como descrito na ISO 14461-2, *Milk and milk products – Quality control in microbiological laboratories – Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps*. Adicionalmente, são descritas as medidas de higiene e segurança que deverão ser aplicadas pelo pessoal de forma a evitar a contaminação das amostras e dos meios de cultura, bem como diminuir potenciais riscos de infeção.

Para além de conter informação relativa ao pessoal, a nova norma (ISO 17728) contém detalhes específicos para o pessoal pertencente à amostragem. Assim, passa a ser dada oportunidade às partes envolvidas, ou seus representantes, de estarem presentes durante a amostragem seguindo os requisitos especiais, sempre que se verifique a necessidade. A amostragem deverá ser sempre feita por pessoal treinado e experiente quer nas técnicas usadas quer no tipo de produto que vai ser amostrado. O conhecimento dos requisitos necessários para a minimização das alterações à flora

microbiana, durante o processo da amostragem e seu transporte deve ser garantido pelo pessoal responsável pela amostragem.

Esta adição de informação na ISO 17728 em relação à ISO 7218, não contradiz nem substitui a informação já existente. Esta informação, como é adicionada para o pessoal da amostragem, torna a informação existente neste capítulo mais completa e específica.

4.1.6. Preparação do material de laboratório

Na norma ISO 7218, no capítulo 6 – Preparação de material de vidro e de outros materiais de laboratório, é dada, primeiramente, informação geral acerca de todos os materiais que poderão estar presentes no laboratório, sendo que estes deverão ser utilizados adequadamente e preparados de forma a preservar a sua limpeza e esterilização, até ao momento do seu uso. A norma enumera e descreve as opções de esterilização, descontaminação e de gestão de resíduos que poderão ser usadas, bem como a lavagem do material e o seu armazenamento.

Na nova norma (ISO 17728), esta informação não se relaciona com a norma anterior, sendo que a informação existente é direcionada para a amostragem. No subcapítulo 7.1 – Equipamento, há a adição de um ponto 7.1.1, onde há a identificação dos materiais que deverão ser utilizados para a descontaminação de embalagens, instrumentos e superfícies das amostras, nomeadamente, na orientação do uso de etanol 70% v/v, compressas impregnadas de álcool ou outros agentes antibacterianos. Além disso, neste mesmo subcapítulo, há informação relativa à condição em que os equipamentos se deverão encontrar.

Tal como no ponto 3.1.5, esta adição de informação sendo só direcionada para a amostragem, torna este capítulo mais específico.

Na Tabela 5, estão presentes os pontos das duas normas da chamada Fase da colheita.

Tabela 5–Tabela de comparação das normas ISO 7218:2007 Amd 2013 e da ISO/TS 17728:2015 relativos a pontos de informação relacionados com a colheita.

Principais Diferenças: Fase da colheita	
ISO 7218:2007 Amd 2013	ISO/TS 17728:2015
Plano de Amostragem	
<u>Não mencionado.</u>	<u>Referido no capítulo 5.</u> Informação sobre amostragem de produtos <i>bulk</i> (produtos a granel).
Equipamento e utensílios	
<u>Referido no capítulo 5.</u> Enumeração do material e utensílios utilizados no laboratório, sua utilidade, manuseamento, limpeza e desinfeção.	<u>Referido nos pontos 7.1; 7.2; 7.3 e 10.1</u> Enumeração e divisão do material e utensílios utilizados para cada tipo de produto a amostrar e seu transporte.
Técnicas de amostragem	

<u>Não mencionado.</u>	<u>Referido no capítulo 7.</u> Orientação do protocolo geral das técnicas de amostragem e descrição do procedimento de colheita de amostra por grupo de produtos.
Embalamento e rotulagem	
<u>Referido nos pontos 8.1.1 e 8.2.</u> Menção de informação generalizada sobre embalagem e rotulagem das amostras.	<u>Referido no capítulo 8.</u> Indicação dos cuidados a reter para o embalamento e condicionamento das amostras após colheita.
Preparação do relatório de amostragem	
<u>Não mencionado.</u>	<u>Referido no capítulo 9.</u> Reforço da necessidade das amostras serem acompanhadas por um relatório padrão fornecido pelo laboratório e assinado pelo pessoal da amostragem.

4.1.7. Plano de amostragem

Na atual norma em utilização (ISO 7218), no capítulo 8 – Amostras de laboratório, no ponto 8.1.2 – Plano de amostragem, apenas consta uma referência a um plano de amostragem, descrevendo a ausência de quaisquer informações na norma.

Com a nova norma ISO 17728, no capítulo 1 – Enquadramento é especificado que os planos de amostragem não integram a norma, no entanto, no capítulo 5 – Plano de amostragem é fornecida informação sobre a amostragem de produtos *bulk* (produtos a granel) (Anexo 1) e é indicada a série ISO 2859, para os planos de amostragem.

Esta adição de informação, poderá ter sido realizada pela falta de detalhes, neste caso, a uma indicação de normas por qual se guiar. Assim, a indicação de quais séries normas ISO a que se deve recorrer, torna a pesquisa do leitor mais facilitada, tal como o acesso às normas.

4.1.8. Equipamento e utensílios

No capítulo 5 – Utensílios e equipamentos da atual norma (ISO 7218) é fornecida informação geral acerca de todos os materiais que poderão ser usados num laboratório de microbiologia alimentar, destacando-se a importância de uma limpeza e verificação constantes, assegurando assim as condições de utilização recomendadas. Assim, os materiais deverão ser verificados, a sua manutenção deve ser feita regularmente, e quando necessário, deverá existir uma calibração dos mesmos. Após enumerados os utensílios e equipamentos utilizados no laboratório, estes são descritos, sendo definida a sua utilização, os seus procedimentos de limpeza e desinfeção e a sua forma de verificação e manutenção.

Com a nova norma (ISO 17728), a informação fornecida difere da norma atual, não existindo sequer uma referência. Existe um aumento da especificidade da informação fornecida sobre os

equipamentos e utensílios utilizados na amostragem e no transporte das amostras, presente nos subcapítulos 7.1 – Equipamento, 7.2 – Técnicas de amostragem: Protocolo geral, 7.3 – Técnicas de amostragem para produtos específicos e 10.1 – Utensílios e equipamento. Existe uma organização dos equipamentos e utensílios, por procedimentos e por grupo de produtos que poderá ser amostrado. É enfatizada a necessidade de que o material utilizado deverá estar no mínimo limpo, e se necessário, estéril.

Tal como no ponto 3.1.5, esta adição de informação é direcionada para a área de amostragem. Por isso, esta adição de informação, além de não influenciar a informação presente na ISO 7218, traz um maior conhecimento sobre a área de amostragem, neste caso os equipamentos utilizados.

4.1.9. Técnicas de amostragem

Apesar de esta informação ser apenas explorada na nova norma, ISO 17728, no capítulo 7 – Técnicas de amostragem, há a transferência de informação da norma atualmente implementada, sendo indicada a série ISO 6887, relativamente à preparação das porções a serem alvo de testes. Com a ISO 17728, passa a existir uma categorização dos produtos que podem ser amostrados com esta norma, estando devidamente enumerada em grupos (Anexo 1) e havendo uma descrição do tipo de produto, do equipamento e do procedimento a utilizar para a colheita de amostra para cada um deles.

A adição deste capítulo na norma tem como objetivo aumentar o conhecimento relativo à área de amostragem, uma vez que há um incremento considerável de informação. A adição da informação presente fornece ao leitor quais os alimentos que podem ser amostrados, em que categoria se inserem e qual o equipamento e procedimento que deverá ser utilizado. Sendo assim, com a informação presente há uma uniformização de procedimentos utilizados e uma diminuição de diferentes interpretações aos procedimentos.

4.1.10. Embalamento e rotulagem

Tal como aconteceu no ponto 3.1.4, relativo aos Princípios e requisitos gerais, na norma atual, a informação referente ao embalamento e rotulagem das amostras encontra-se dispersa em vários pontos da norma. A informação da atual norma (ISO 7218) torna-se a informação base para a nova norma (ISO 17728), sendo esta totalmente concentrada num único ponto de análise, o capítulo 8 – Embalamento e rotulagem das amostras. No entanto, há um acréscimo de informação em relação aos *shipping seals*, sendo que poderão ser solicitados pelo cliente como prova de que não foi realizada nenhuma adulteração à amostra durante a amostragem e a sua análise.

Tal como no ponto 3.1.4, a informação relativamente aos mesmos pontos foram compactadas num só, facilitando a sua leitura.

4.1.11. Preparação do relatório de amostragem

Tal como o ponto 3.1.9, relativo às técnicas de amostragem, este tópico só é explorado na nova norma (ISO 17728), no capítulo 9 – Preparação do formulário da amostragem (relatório de amostragem), sendo mencionada a necessidade do preenchimento de um formulário fornecido pelo laboratório com as informações referentes à identificação do local de amostragem e data, caracterização das amostras colhidas e finalidade das análises. Caso haja alguma condição, circunstância ou informação relevante acerca do produto amostrado, este deve ser incluído no relatório.

Apesar de este ponto só ser abordado na nova norma, há informação mencionada que converge com a fornecida na norma atual. Na nova norma, é elaborada uma listagem de informação adicional que deve ser enviada a par do relatório para o laboratório, garantindo a identificação das amostras aquando da sua receção. Dessa listagem (Anexo 1), algumas informações já são mencionadas na norma atualmente implementada, nomeadamente a identificação temporal da amostragem (data e hora) e a identificação do cliente (nome e morada).

A adição deste capítulo vem trazer uma uniformização do processo de identificação das amostras e de toda a informação necessária para a sua receção no laboratório. De certa forma, esta mesma informação adicionada, vem trazer uma distribuição de responsabilidades entre cliente, pessoal da amostragem e laboratório. Esta distribuição de responsabilidades poderá levar a uma transmissão de informação entre todas as partes envolvidas com a finalidade de uma melhor análise e interpretação de resultados.

Na Tabela 6, estão presentes os pontos das duas normas da chamada Fase pós-colheita.

Tabela 6–Tabela de comparação das normas ISO 7218:2007 Amd 2013 e da ISO/TS 17728:2015 relativos a pontos de informação após colheita.

Principais Diferenças: Fase pós-colheita	
ISO 7218:2007 Amd 2013	ISO/TS 17728:2015
Transporte	
<u>Referido no ponto 8.2.</u> Reforço da importância das condições de transporte para a minimização de alterações do número de microrganismos presentes na amostra.	<u>Referido no capítulo 10.</u> Adição de uma nova temperatura de transporte de produtos refrigerados. Realização do protocolo de transporte pelo laboratório ou por um subcontratado. Adição de informação sobre cuidados a ter durante o transporte até à receção das amostras no laboratório.
Receção e Armazenamento	
<u>Referido no ponto 8.3 e 8.4.</u> Reforço da possibilidade do laboratório rejeitar as amostras aquando da sua receção no caso destas	<u>Referido no capítulo 11.</u> Critérios de aceitação da amostra acordados com o cliente, sendo a sua verificação aquando a receção.

<p>não se apresentarem nas condições acordadas para análise. Reforço da importância das condições de armazenamento para a minimização de alterações do número de microrganismos presentes na amostra.</p>	
Anexos	
<p>Anexo A: Propriedades de alguns desinfetantes. Anexo B: Intervalo de confiança para técnicas e contagem de colônias. Anexo C: Determinação do número mais provável. Anexo D: Contagem de colônias <i>two dishes per dilution</i>.</p>	<p>Anexo A – Fluxograma das amostras. Anexo B – Método de amostragem para peças ou blocos de gelo.</p>

4.1.12. Transporte

Tal como observado em pontos anteriormente explorados, a referência ao transporte encontra-se presente nas duas normas. Na norma atual (ISO 7218), é feito o reforço de vários métodos, com a finalidade de preservar a integridade da amostra, como exemplo, o embalamento ser realizado de forma a não ocorrer perdas ou quebras, sendo que as amostras devem ser entregues ao laboratório nas condições de armazenamento originais, entre outros cuidados. Na norma, são recomendadas temperaturas para o transporte das amostras, sendo estas especificadas de acordo com o estado de preservação da amostra. No entanto, a referência a estas temperaturas remonta a situações onde não exista, *à priori*, outras normas implementadas com temperaturas já padronizadas.

Ainda é recomendado que, caso não haja condições especificadas, deverá ser acordado, entre todas as partes envolvidas, a duração e a temperatura em que deverá ser realizado o transporte.

Na nova norma (ISO 17728), logo no início do capítulo 10 – Transporte, é referenciada a norma atual (ISO 7218), sendo semelhante a informação relacionada com este ponto. No entanto, é adicionada informação complementar à pré-existente. O transporte deverá ser realizado a temperatura controlada e no menor tempo possível, não superando as 24 horas. É referida uma temperatura adicional para o transporte de amostras, relativa a produtos refrigerados (abaixo de 8°C). A informação referente ao transporte de marisco, incluindo a temperatura de transporte e os cuidados a serem considerados são adicionados a esta norma (Anexo 1). Existe uma inclusão do protocolo de transporte no subcapítulo 10.2 – Protocolo de transporte, sendo inicialmente mencionado que o transporte poderá ser feito ou pelo laboratório ou por um subcontratado, havendo informação separada para cada caso. No entanto, as condições de transporte são da responsabilidade ou do pessoal da amostragem ou do cliente e deve ser acordado qual o transporte mais adequado a ser usado tal como o método de entrega ao laboratório. Acerca do protocolo releva-se a informação extra, tais como os fatores críticos que deverão ser considerados (Anexo 1), a amostra adicional para

efeitos de monitorização da temperatura e os cuidados que devem ser cumpridos no transporte de produtos altamente perecíveis.

Sendo dos capítulos onde é notável uma adição de informação relativamente à ISO 7218, esta informação tem como objetivo, por um lado uma uniformização de procedimentos de conserva de amostras e de seu transporte, sendo que a informação adicionada poderá levar uma diminuição de diferentes interpretações, e por outro, uma distribuição de responsabilidades, dando possibilidade ao cliente de poder ter possibilidade de escolha no transporte de amostras.

4.1.13. Receção e Armazenamento

Tal como acontece no ponto imediatamente acima, na nova norma (ISO 17728), a primeira indicação feita é a referência da norma atual (ISO 7218) para a receção e para o armazenamento. A atual, no capítulo 11 – Receção no laboratório, menciona a necessidade de avaliação das condições das amostras, aquando da sua receção ao laboratório, havendo a possibilidade de estas serem rejeitadas, caso não se apresentem em condições aceitáveis. São listadas as informações que deverão ser registadas (data e hora, detalhes da amostragem e a condição em que se encontra a amostra, nome e morada do cliente) sendo que as amostras deverão ser identificadas e codificadas de forma a possibilitar o seu rastreamento nas diferentes fases da análise. É dada especial atenção aos produtos perecíveis relativamente à janela temporal em que devem ser realizadas as análises após a sua amostragem. A atual norma refere o armazenamento das amostras de forma direta ou indireta (remetendo para outras normas) relativamente às temperaturas a adotar consoante o tipo de produto em questão.

Na nova norma, além da informação já acima mencionada, é estabelecido um critério de aceitação das amostras com o cliente e verificação de que estas são cumpridas aquando da receção.

É de notar, que tal como anteriores capítulos, a adição de informação vem uniformizar os procedimentos já estabelecidos e distribuição de responsabilidades, neste caso, com a aceitação das amostras.

4.1.14. Anexos

Os anexos presentes na norma atual (ISO 7218) são relativos às propriedades dos desinfetantes que poderão ser utilizados em laboratório, aos intervalos de confiança para a contagem de colónias, à determinação do número mais provável e à contagem de colónias quando existem duas placas por diluição.

Na nova norma (ISO 17728) os anexos são relativos ao fluxo de amostras e ao método de amostragem para peças ou blocos de gelo.

É de reforçar que os anexos existentes em cada norma, serão de acordo com o âmbito/enquadramento desta. Sendo assim, é de esperar que ambas as normas não possuam os mesmos anexos.

Os capítulos presentes na norma ISO 7218, mas que não se encontram no âmbito da ISO 17728, não foram abordados nesta comparação, estando presentes no Anexo 1. Sendo assim, se o laboratório decidir implementar a norma de interesse estes capítulos continuariam abrangidos pela norma atualmente implementada, a ISO 7218.

O estudo comparativo entre normas poderá ter um forte impacto na tomada de decisão de implementação de normas. Este estudo suporta a compreensão se a implementação da norma ISO/TS 17728:2015 é benéfica para o laboratório, no sentido de procurar uma melhoria contínua nos seus procedimentos e, conseqüentemente, na obtenção de resultados.

A comparação, análise de cada ponto e reflexão sobre a informação fornecida por ambas as normas, torna notório que a norma de interesse para este estudo comparativo, a ISO/TS 17728:2015, é uma norma atualizada, completa e específica para a sua área de atuação. Analisando a nível teórico, a norma de interesse traz melhorias em relação à ISO 7218:2007 Amd 2013, no sentido em que a informação adicionada permite uma interpretação mais objetiva e homogénea do seu conteúdo. A especificidade que a ISO 17728 introduz, poderá levar a uma uniformização dos processos por parte do laboratório e a um maior conhecimento na área das colheitas. No entanto, esta mesma especificidade em alguns capítulos, não se traduz em melhorias, devido à informação na ISO 7218 ser generalizada.

A informação adicional, além de facilitar a interpretação da informação previamente estabelecida, diminuindo a multiplicidade de interpretações, veio também distribuir responsabilidades por todas partes envolvidas (laboratório, pessoal de amostragem, cliente).

Após esta comparação, e antes de tomar decisões, é essencial para o laboratório fazer a análise do seu método interno e verificar se estas melhorias implementadas pela norma ISO 17728 já terão sido verificadas aquando da implementação do seu método interno.

4.2. Cálculo das Incertezas

4.2.1. Contagem de colónias

Realizado o cálculo da contagem de unidades formadoras de colónias (UFC), estes valores foram convertidos em logaritmo de 10 (\log_{10}). Para uma melhor interpretação, os valores de \log_{10} dos valores da contagem de colónias tal como outros parâmetros estatístico para cada ensaio realizado

para cada matriz como os valores médios dos ensaios de cada matriz alimentar e zaragatoas foram resumidas nas Tabelas 7 a 10.

Tabela 7–Sumário das contagens de colónias em 1 amostra em duplicado (2 para carcaças) de cada matriz alimentar analisada.

Matriz	Ensaio	Contagem de colónias (como log ₁₀ UFC/g ou /mL)			Média Geral	Mediana Geral	Variância Geral	Desvio-padrão Geral
		Média	Variância	Desvio-padrão				
Carne picada cozinhada	P1	2,587	0,001	0,0361	2,601	2,597	0,001	0,0382
	P2	2,616	0,002	0,0474				
Salsicha fresca	P1	2,461	0,006	0,0771	2,750	2,766	0,114	0,3375
	P2	3,039	0,001	0,0325				
Folhado misto cru	P1	8,185	0,003	0,0587	8,123	8,106	0,006	0,0795
	P2	8,061	0,0001	0,0120				
Coxinha de frango cozinhada	P1	2,089	0,001	0,0223	2,013	2,016	0,008	0,0912
	P2	1,936	0,001	0,0325				
Carcaça 1	P1	4,129	0,001	0,0247	4,183	4,177	0,005	0,0692
	P2	4,238	0,002	0,0431				
Carcaça 2	P1	3,63	0,011	0,1032	3,651	3,664	0,005	0,0733
	P2	3,668	0,004	0,0656				

Tabela 8– Análise conjunta dos valores log¹⁰ dos duplicados das duas amostras de carcaças.

Média Geral	Mediana Geral	Variância Geral	Desvio-padrão Geral
3,917	3,913	0,085	0,292

Após a obtenção dos valores de UFC para cada matriz, realizou-se uma análise comparativa entre os valores para cada matriz (Tabelas 7 a 10). A matriz folhado misto e coxinha de frango obtiveram o valor máximo e mínimo de carga de UFC/g, atingindo níveis de 8,123 e 2,103, respetivamente. Dado que o folhado misto não é submetido a um processo de cozedura, seria expectável que apresentasse uma maior carga microbiana. O processo oposto ocorre com a coxinha de frango, submetida a um processo térmico e, por inerência, a uma redução da carga microbiana presente. Na tabela 7 está apresentada uma análise da variância geral dos valores para cada matriz. A matriz salsicha fresca foi identificada com uma maior variância (0,114), sendo que a carne picada se apresenta no lado oposto do espectro, caracterizando-se pela sua reduzida variabilidade (0,001). Estes valores poderão ser explicados de várias formas, salientando-se a heterogeneidade presente nas matrizes em estudo.

Esta heterogeneidade resultante poderá advir da distribuição espacial dos microrganismos no produto e da condição em que estes se apresentam e se estes se apresentam na superfície da matriz ou no interior desta (65). Apesar de apresentar a maior carga microbiana (8,123), a matriz folhado misto, apresenta uma variância reduzida (0,006). Esta situação poderá ser explicada pela distribuição dos microrganismos nos alimentos, sendo que existem três tipos de distribuição espacial: aleatória, regular ou heterogénea (66). Devido ao número alto de UFC, a dispersão espacial da população poderá tender a ser regular e a variância de valores tenderá a ser diminuta (54). Devido à situação atual em que vivemos, o número de amostras analisadas foram reduzidas. Este reduzido número de amostras analisadas, nomeadamente de uma só amostra para alimentos e um duplicado para carcaças, não permite retirar ilações sobre a distribuição dos microrganismos em estudo nem assumir uma distribuição normal dos dados obtidos.

Relativamente aos dados obtidos com as amostras de zaragatoa (Tabelas 9 e 10), foi feita uma abordagem considerando duas situações distintas: valores das zaragatoas analisadas na totalidade, desconsiderando os diferentes processos de amostragem e os valores das zaragatoas que foram obtidas quer através de amostragens a clientes, quer através de contaminação e amostragem em laboratório, de forma isolada. Através desta análise conclui-se que as zaragatoas contaminadas em laboratórios apresentavam uma média de UFC mais elevada comparativamente às amostras obtidas pelos clientes, no entanto, uma maior variância foi obtida nas zaragatoas processadas externamente ao laboratório. Estes valores estão relacionados com a forma de amostragem dado que a contaminação de zaragatoas em laboratório foi realizada de forma uniforme e com a mesma carga microbiana enquanto que as amostragens a clientes dependiam da carga microbiana presente em diferentes amostragens e, portanto, apresentavam uma maior variabilidade derivada do processo.

Tabela 9- Sumário das contagens de colónias e vários parâmetros estatísticos para zaragatoas em análise. São apresentados dois grupos de zaragatoas: zaragatoas amostradas de clientes (5 amostras) e zaragatoas contaminadas em laboratório (8 amostras).

Matriz	Ensaio	Contagem de colónias (como log ₁₀ UFC/g ou /mL)			Média Geral	Mediana Geral	Variância Geral	Desvio-padrão Geral
		Média	Variância	Desvio-padrão				
Zaragatoa 400	P1	1,392	0,0008	0,0285	1,518	1,514	0,022	0,1483
	P2	1,644	0,0017	0,0410				
Zaragatoa 401	P1	0,837	0,0009	0,0293	0,820	0,827	0,0014	0,0374
	P2	0,804	0,0022	0,0473				
Zaragatoa 435	P1	1,033	0,0014	0,0373	1,054	1,053	0,0017	0,0411
	P2	1,076	0,0018	0,0421				
Zaragatoa 432	P1	0,745	0,0013	0,0362	0,724	0,732	0,0022	0,0468
	P2	0,703	0,0036	0,0596				
	P1	0,778	0,0070	0,0835	0,776	0,778	0,0069	0,0833

Zaragatoa 424	P2	0,774	0,0138	0,1176				
Zaragatoa C- 2021854	P1	1,289	0,0007	0,0258	1,228	1,233	0,0057	0,0757
	P2	1,167	0,0017	0,0410				
Zaragatoa C- 2021855	P1	1,792	0,0006	0,0243	1,806	1,806	0,0006	0,0247
	P2	1,819	0,0005	0,0229				
Zaragatoa C- 2021856	P1	1,621	0,0019	0,0433	1,649	1,655	0,0019	0,0439
	P2	1,677	0,0008	0,0275				
Zaragatoa C- 2021857	P1	1,501	0,0004	0,0190	1,554	1,549	0,0041	0,0641
	P2	2,606	0,0010	0,0324				
Zaragatoa C- 2021858	P1	1,704	0,0001	0,0116	1,822	1,822	0,0006	0,0244
	P2	1,680	0,0002	0,0127				
Zaragatoa C- 2021859	P1	1,704	0,0023	0,0476	1,692	1,696	0,0021	0,0457
	P2	1,680	0,0034	0,0587				
Zaragatoa C- 2021860	P1	1,387	0,0002	0,0124	1,351	1,381	0,0049	0,0697
	P2	1,316	0,0094	0,0968				
Zaragatoa C- 2021861	P1	1,470	0,0007	0,0267	1,480	1,477	0,0036	0,0598
	P2	1,431	0,0003	0,0186				

Tabela 10- – Análise conjunta dos valores \log_{10} dos duplicados das amostras de zaragatoas sendo a) Conjunto das trezes zaragatoas e duplicados; b) conjunto das cinco zaragatoas amostradas em clientes e seus duplicados; c) conjunto das oito zaragatoas contaminadas em laboratório e seus duplicados.

	Média Geral	Mediana Geral	Variância Geral	Desvio-padrão Geral
a)	1,344	1,415	0,1467	0,3830
b)	0,979	0,847	0,0955	0,3090
c)	1,573	1,610	0,0427	0,2066

4.2.2. Análise de amplitudes de duplicados

O cálculo da Incerteza através da análise de duplicados foi realizada para todas as matrizes em estudo, tendo sido obtido o valor da incerteza separado (análise e amostragem) e em conjunto (amostragem + análise) estando os valores dos cálculos presentes nas Tabelas 11 a 15 para cada matriz separadamente.

Tabela 11- Valores da incerteza da análise, amostragem e processo de amostragem e análise em conjunto para a matriz salsicha fresca.

Nº Amostra	Ensaio 1				Ensaio 2				
	P_{i11}	P_{i12}	$D_{i1}= P_{i11}-P_{i12} $	\bar{X}_{i1}	P_{i21}	P_{i22}	$D_{i2}= P_{i21}-P_{i22} $	\bar{X}_{i2}	
1	255	327	$D_{i1}=72$	291,1	1155	1036	$D_{i2}=119$	1096	$D_i=1023$
			$\bar{D}_{i1}=72$				$\bar{D}_{i2}=119$		$\bar{D}_{\text{Amostragem + Análise}}=1023$

Análise	$\bar{D}_{Análise} = \frac{\bar{D}_{i1} + \bar{D}_{i2}}{2} = 95,64$	$DP_{Análise} = \frac{\bar{D}_{Análise}}{1,128} = 84,78$ $DPR_{Análise}(\%) = \frac{DP_{Análise}}{\bar{X}} \times 100 = 12\%$
Análise + Amostragem	$\bar{D}_{Amostragem + Análise} = \frac{\sum D_i}{n} = 1023$	$DP_{Amostragem + Análise} = \frac{\bar{D}_{Amostragem + Análise}}{1,128} = 907,12$
Amostragem	$DP_{amostragem} = \sqrt{DP_{Amostragem + Análise}^2 - \left(\frac{DP_{Análise}}{\sqrt{2}}\right)^2} = 905,13$ $DPR_{Amostragem} = \frac{DP_{amostragem}}{\bar{X}} \times 100 = 131\%$	

Tabela 12 - Valores da incerteza da análise, amostragem e processo de amostragem e análise em conjunto para a matriz coxinha de frango.

Nº Amostra	Ensaio 1				Ensaio 2				D _i = $\bar{X}_{i1} - \bar{X}_{i2}$
	P _{i11}	P _{i12}	D _{i1} = P _{i11} - P _{i12}	\bar{X}_{i1}	P _{i21}	P _{i22}	D _{i2} = P _{i21} - P _{i22}	\bar{X}_{i2}	
1	127	118	D ₁₁ = 9	123	91	82	D ₁₂ = 9	87	D ₁ = 36
			$\bar{D}_{i1} = 9$				$\bar{D}_{i2} = 9$		$\bar{D}_{Amostragem + Análise} = 36$
Análise	$\bar{D}_{Análise} = \frac{\bar{D}_{i1} + \bar{D}_{i2}}{2} = 9$				$DP_{Análise} = \frac{\bar{D}_{Análise}}{1,128} = 7,979$ $DPR_{Análise}(\%) = \frac{DP_{Análise}}{\bar{X}} \times 100 = 8\%$				
Análise + Amostragem	$\bar{D}_{Amostragem + Análise} = \frac{\sum D_i}{n} = 36$				$DP_{Amostragem + Análise} = \frac{\bar{D}_{Amostragem + Análise}}{1,128} = 31,91$				
Amostragem	$DP_{amostragem} = \sqrt{DP_{Amostragem + Análise}^2 - \left(\frac{DP_{Análise}}{\sqrt{2}}\right)^2} = 31,41$ $DPR_{Amostragem} = \frac{DP_{amostragem}}{\bar{X}} \times 100 = 30\%$								

Tabela 13 - Valores da incerteza da análise, amostragem e processo de amostragem e análise em conjunto para a matriz folhado misto.

Nº Amostra	Ensaio 1				Ensaio 2				D _i = $\bar{X}_{i1} - \bar{X}_{i2}$
	P _{i11}	P _{i12}	D _{i1} = P _{i11} - P _{i12}	\bar{X}_{i1}	P _{i21}	P _{i22}	D _{i2} = P _{i21} - P _{i22}	\bar{X}_{i2}	
1	$1,68 \times 10^8$	$1,39 \times 10^8$	D ₁₁ = $2,9 \times 10^7$	$1,50 \times 10^8$	$1,17 \times 10^8$	$1,13 \times 10^8$	D ₁₂ = $4,5 \times 10^6$	$1,20 \times 10^8$	D ₁ = $3,9 \times 10^7$
			$\bar{D}_{i1} = 2,9 \times 10^7$				$\bar{D}_{i2} = 4,5 \times 10^6$		$\bar{D}_{Amostragem + Análise} = 3,9 \times 10^7$
Análise	$\bar{D}_{Análise} = \frac{\bar{D}_{i1} + \bar{D}_{i2}}{2} = 1,68 \times 10^7$				$DP_{Análise} = \frac{\bar{D}_{Análise}}{1,128} = 1,49 \times 10^7$ $DPR_{Análise}(\%) = \frac{DP_{Análise}}{\bar{X}} \times 100 = 11\%$				

Análise + Amostragem	$\bar{D}_{\text{Amostragem + Análise}} = \frac{\sum D_i}{n} = 3,9 \times 10^7$	$DP_{\text{Amostragem+Análise}} = \frac{\bar{D}_{\text{Amostragem+Análise}}}{1,128} = 3,4 \times 10^7$
Amostragem	$DP_{\text{amostragem}} = \sqrt{\frac{DP_{\text{Amostragem+Análise}}^2 - \left(\frac{DP_{\text{Análise}}}{\sqrt{2}}\right)^2}{1,39 \times 10^8}} = 3,26 \times 10^7$ $DPR_{\text{Amostragem}} = \frac{DP_{\text{amostragem}}}{\bar{x}} \times 100 = 24 \%$	

Tabela 14 - Valores da incerteza da análise, amostragem e processo de amostragem e análise em conjunto para a matriz carcaças.

Nº Amostra	Ensaio 1				Ensaio 2				
	P _{i11}	P _{i12}	D _{i1} = P _{i11} - P _{i12}	\bar{x}_{i1}	P _{i21}	P _{i22}	D _{i2} = P _{i21} - P _{i22}	\bar{x}_{i2}	
1	12909	14000	D ₁₁ =1091	13454,5	16091	18545	D ₁₂ =2454	17318	D ₁ =3864
2	3636	5091	D ₂₁ =1455	4363,5	4182	5182	D ₂₂ = 1000	4682	D ₂ = 319
			$\bar{D}_{i1} = 1500$				$\bar{D}_{i2} = 1727$		$\bar{D}_{\text{Amostragem + Análise}} = 2091$
Análise	$\bar{D}_{\text{Análise}} = \frac{\bar{D}_{i1} + \bar{D}_{i2}}{2} = 1500$						$DP_{\text{Análise}} = \frac{\bar{D}_{\text{Análise}}}{1,128} = 1329,79$ $DPR_{\text{Análise}}(\%) = \frac{DP_{\text{Análise}}}{\bar{x}} \times 100 = 13\%$		
Análise + Amostragem	$\bar{D}_{\text{Amostragem + Análise}} = \frac{\sum D_i}{n} = 2091$						$DP_{\text{Amostragem+Análise}} = \frac{\bar{D}_{\text{Amostragem+Análise}}}{1,128} = 1853,72$		
Amostragem	$DP_{\text{amostragem}} = \sqrt{\frac{DP_{\text{Amostragem+Análise}}^2 - \left(\frac{DP_{\text{Análise}}}{\sqrt{2}}\right)^2}{1,39 \times 10^8}} = 1597,54$ $DPR_{\text{Amostragem}} = \frac{DP_{\text{amostragem}}}{\bar{x}} \times 100 = 16\%$								

Tabela 15 - Valores da incerteza da análise, amostragem e processo de amostragem e análise em conjunto para a matriz higiene de superfícies (zaragatoa) com base na análise dos duplicados.

Nº Amostra	Ensaio 1				Ensaio 2				
	P _{i11}	P _{i12}	D _{i1} = P _{i11} - P _{i12}	\bar{x}_{i1}	P _{i21}	P _{i22}	D _{i2} = P _{i21} - P _{i22}	\bar{x}_{i2}	
1	24	26	D ₁₁ =2	25	41	47	D ₁₂ = 6	44	D ₁ = 19
2	7	7	D ₂₁ =0	7	6	7	D ₂₂ = 1	6,5	D ₂ = 0,5
3	11	10	D ₃₁ =1	10,5	11	13	D ₃₂ = 2	12	D ₃ = 1,5

4	5	6	$D_{41} = 1$	5,5	6	5	$D_{42} = 1$	5,5	$D_4 = 0$	
5	5	7	$D_{51} = 2$	6	7	5	$D_{52} = 2$	6	$D_5 = 0$	
6	19	20	$D_{61}=1$	19,5	14	16	$D_{62} = 2$	15	$D_6 = 4,5$	
7	64	60	$D_{71} = 4$	62	63	68	$D_{72} = 5$	65,5	$D_7 = 3,5$	
8	39	45	$D_{81} = 6$	42	50	45	$D_{82} = 5$	47,5	$D_8 = 5,5$	
9	33	31	$D_{91} = 2$	32	38	43	$D_{92} = 5$	40,5	$D_9 = 8,5$	
10	68	71	$D_{101} = 3$	69,5	65	62	$D_{102} = 3$	63,5	$D_{10} = 6$	
11	47	55	$D_{111} = 8$	51	44	53	$D_{112} = 9$	48,5	$D_{11} = 2,5$	
12	24	25	$D_{121} = 1$	24,5	18	24	$D_{122} = 6$	21	$D_{12} = 3,5$	
13	32	35	$D_{131} = 3$	33,5	28	26	$D_{122} = 2$	27	$D_{13} = 6,5$	
			$\bar{D}_{i1} = \frac{\sum D_{i1}}{n} =$ 2,62				$\bar{D}_{i2} = \frac{\sum D_{i2}}{n} =$ 3,77		$\bar{D}_{\text{Amostragem} + \text{Análise}}$ 4,73	
Análise			$\bar{D}_{\text{Análise}} = \frac{\bar{D}_{i1} + \bar{D}_{i2}}{2} = 3,19$				$DP_{\text{Análise}} = \frac{\bar{D}_{\text{Análise}}}{1,128} = 2,83$ $DPR_{\text{Análise}}(\%) = \frac{DP_{\text{Análise}}}{\bar{x}} \times 100 = 9,3 \%$			
Análise + Amostragem			$\bar{D}_{\text{Amostragem} + \text{Análise}} = \frac{\sum D_i}{n} = 4,73$				$DP_{\text{Amostragem} + \text{Análise}} = \frac{\bar{D}_{\text{Amostragem} + \text{Análise}}}{1,128} =$ 4,194			
Amostragem			$DP_{\text{amostragem}} = \sqrt{DP_{\text{Amostragem} + \text{Análise}}^2 - \left(\frac{DP_{\text{Análise}}}{\sqrt{2}}\right)^2} = 3,686$ $DPR_{\text{Amostragem}} = \frac{DP_{\text{amostragem}}}{\bar{x}} \times 100 = 12\%$							

Na Tabela 18 estão agrupados os valores da incerteza da análise e de amostragem, tal como o seu peso relativo (%) para cada matriz, tendo sido o cálculo realizado separadamente para cada uma.

Tabela 16 – Sumário dos valores de incerteza da análise e amostragem obtidos pela análise de amplitudes de duplicados.

Matriz	$DP_{\text{Análise}}$	$DPR_{\text{Análise}}(\%)$	$DP_{\text{amostragem}}$	$DPR_{\text{Amostragem}}(\%)$
Carne picada	48,32	12%	(-)	(-)
Salsicha fresca	84,79	12 %	905,13	131 %
Coxinha de frango	7,979	8 %	31,41	30 %
Folhado misto	$1,49 \times 10^7$	11 %	$3,26 \times 10^7$	24 %
Carçaça	1329,787	13 %	1597,537	16 %

Analisando os valores obtidos para o cálculo das incertezas relativas à análise e amostragem, observou-se que a matriz coxinha de frango apresenta o valor mais baixo para a incerteza da análise e a matriz carcaça para a incerteza da amostragem. A matriz carne picada não apresenta um valor referente à incerteza da amostragem, pois o seu valor não foi possível de ser calculado (raiz quadrada de um valor negativo).

É possível observar que os valores obtidos para o cálculo da incerteza da análise estão compreendidos entre 8 e 13%, demonstrando-se menos dispersos que os valores obtidos para a incerteza da amostragem. Enquanto que o procedimento utilizado para a análise é idêntico em todas as matrizes, o processo de amostragem é, por variados motivos, mais propício a diferenças metodológicas, resultando nestas diferenças evidentes relativamente ao cálculo de incertezas. Sendo as matrizes alimentares diferentes entre si, os planos de amostragem utilizados para os mesmo também serão diferentes, inclusive na obtenção de amostra, pontos de colheita e valores de microrganismos aceitáveis, como descritos no Regulamento (CE) Nº 1441/2007 (22).

A matriz carcaça apresenta um valor de incerteza de amostragem mais reduzido em relação às outras matrizes, no entanto, este valor poderá ser em resultado de um maior número de amostras em análise (duas amostras em vez de uma). Um número maior de amostras levará a um intervalo de valores mais próximos ou menos dispersos, diminuindo a variância, e por consequente, a incerteza (67,68).

O valor da incerteza da amostragem para a salsicha fresca poderá ser resultante da constituição e tamanho da porção teste para a análise. Na amostragem de alimentos com constituição heterogênea, as amostras retiradas do lote em análise não serão idênticas entre si no que diz respeito à distribuição de microrganismos. De forma semelhante, a distribuição dos microrganismos poderá não ser uniforme na porção teste analisada, originando valores de UFC diferentes entre amostras e duplicados, aumentando a variância e, consequentemente incerteza (68). Analisando os valores médios \log_{10} das colónias, as diferenças entre estes vai de acordo com a informação relatada.

Devido à situação atual, não houve uma possibilidade de um maior número de amostras analisadas para cada matriz em estudo. Devido aos valores baixo de amostra (uma para cada matriz alimentar, duas para as carcaças), não será possível uma conclusão acerca da incertezas (tanto da análise como da amostragem). Estudos anteriores relataram que para um aumento da precisão de resultados, o número de amostras deverá ser de pelo menos oito. No entanto, dependendo da matriz em análise poderá ser necessário um maior número de amostras para se obter o mesmo grau de precisão (43,67). Sendo assim será de interesse para o laboratório, de forma a poder uma melhor

percepção do peso tanto da amostragem como da análise para cada matriz, a realização da análise com um maior número de amostras, sendo que no mínimo serão oito amostras.

4.2.3. Análise ANOVA

A análise ANOVA para o cálculo das variâncias da análise e da amostragem foi realizada para as treze amostras de zaragatoas, cujo valores se encontram nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 17- Cálculo da variância da análise e, conseqüentemente, a incerteza relativa à análise com base na análise da ANOVA.

	P ₁₁	P ₁₂	P ₂₁	P ₂₂	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂
	X _{n11}	X _{n12}	X _{n21}	X _{n22}	\bar{X}_{n1}	\bar{X}_{n2}	$2D_{n1(\bar{x})}^2$	$2D_{n2(\bar{x})}^2$
1	24	26	41	47	25	44	2	18
2	7	7	6	7	7	6,5	0	0,5
3	11	10	11	13	10,5	12	0,5	2
4	5	6	6	5	5,5	5,5	0,5	0,5
5	5	7	7	5	6	6	2	2
6	19	20	14	16	19,5	15	0,5	2
7	64	60	63	68	62	65,5	8	12,5
8	39	45	50	45	42	47,5	18	12,5
9	33	31	38	43	32	40,5	2	12,5
10	68	71	65	62	69,5	63,5	4,5	4,5
11	47	55	44	53	51	48,5	32	40,5
12	24	25	18	24	24,5	21	0,5	18
13	32	35	28	26	33,5	27	4,5	2
$\bar{x} = 30,40$					$SQ_{Análise} = 2 \sum_{i=1}^n [D_{i1(\bar{x})}^2 + D_{i2(\bar{x})}^2] = 202,5$			
$gl_{Análise} = i.j.k - i.j = 26$					$Variância_{Análise} = \frac{SQ_{Análise}}{gl_{Análise}} = 7,789$			

$DP_{Análise} = \sqrt{\frac{Variância_{Análise}}{2,791}}$	$DPR_{Análise}(\%) = \frac{DP_{Análise}}{\bar{x}} \times 100 = 9,2\%$
---	---

Tabela 18-- Cálculo da variância da amostragem e, conseqüentemente, a incerteza relativa à amostragem com base na análise da ANOVA.

	P ₁₁	P ₁₂	P ₂₁	P ₂₂	P ₁	P ₂	\bar{X}_n	$D^2_{n(\bar{x})}$
1	24	26	41	47	25	44	35	90,25
2	7	7	6	7	7	6,5	7	0,06
3	11	10	11	13	10,5	12	11	0,56
4	5	6	6	5	5,5	5,5	6	0,00
5	5	7	7	5	6	6	6	0,00
6	19	20	14	16	19,5	15	17	5,06
7	64	60	63	68	62	65,5	64	3,06
8	39	45	50	45	42	47,5	45	7,56
9	33	31	38	43	32	40,5	36	18,06
10	68	71	65	62	69,5	63,5	67	9,00
11	47	55	44	53	51	48,5	50	1,56
12	24	25	18	24	24,5	21	23	3,06
13	32	35	28	26	33,5	27	30	10,56
$\bar{x} = 30,40$					$SQ_{Amostragem} = 4 \times \sum_{i=1}^n D^2_{i(\bar{x})} = 595,25$			
$gl_{Amostragem} = i.j - i = 13$					$Variância_{Amostragem} = \frac{SQ_{Amostragem}}{gl_{Amostragem}} - \frac{SQ_{Análise}}{gl_{Análise}} = 19$			
$DP_{Amostragem} = \sqrt{Variância_{Amostragem}} = 4,36$					$DPR_{Amostragem}(\%) = \frac{DP_{Amostragem}}{\bar{x}} \times 100 = 14,3\%$			

Na tabela 19 estão agrupados os valores das incertezas calculadas para a matriz higiene de superfícies (zaragatoa) utilizando o cálculo An_{dup} e o cálculo An_{ANOVA} , de forma a ser possível compreender se os valores são concordantes entre si.

Tabela 19- Valores dos cálculos da incerteza para a matriz higiene de superfícies (zaragatoa) utilizando a análise das amplitudes dos duplicados (An_{dup}) e a análise da ANOVA (An_{ANOVA}).

	$DP_{Análise}$	$DPR_{Análise}(\%)$	$DP_{amostragem}$	$DPR_{Amostragem}(\%)$
An_{dup}	2,83	9,3%	3,686	12,1%
An_{ANOVA}	2,791	9,2%	4,36	14,3%

Verifica-se que o valor da incerteza obtido por ambos os métodos é semelhante. Da mesma forma, o peso da incerteza da amostragem não apresenta diferenças em relação ao peso da incerteza da análise. De modo a ser possível chegar a uma conclusão se era possível ou não a utilização destes métodos em contexto alimentar, foi realizado a incerteza da análise com o método de cálculo implementado na área alimentar, a ISO 19036:2019 (43). Através deste método de cálculo, o peso da incerteza da análise obtido foi aproximadamente de 4 % (Anexo 2). Comparando este valor com os valores que foram obtidos com os métodos do guia da RELACRE, é possível observar que este método apresenta mais de metade do peso da análise. No entanto, aquando da realização do cálculo da incerteza da análise utilizando a ISO 19036:2019, não foram tido em conta todos os pressupostos que este método tem em conta. Não foi tido em conta todos os fatores de variabilidade que este método exige, podendo o valor que foi obtido, ser resultado de uma subestimação da incerteza da análise.

As fontes de variabilidade que poderão afetar a incerteza total, inserem-se em várias fases da análise, estando incluídas tanto a amostragem como a análise em laboratório. Um dos exemplos dessas fontes de variabilidade poderá ser o efeito da matriz da amostra e as interferências que esta poderá provocar. Os erros associados à matriz poderá ser a distribuição dos microrganismos na matriz, em que condições os microrganismos se encontram (viáveis ou não), se estão distribuídos pela matriz ou se encontram-se à superfície (65).

O próprio método microbiológico, tem associado a ele um conjunto de processos que influenciam a incerteza, desde a medição da porção teste, a sua homogeneização até ao plaqueamento e contagem das UFC estando associados a incerteza de todos os equipamentos utilizados, tal como valores de referência, aproximações de valores realizados, entre outros (65).

A porção teste e a quantidade que a constitui, dez gramas, poderá ser um fator determinante para um valor de incerteza maior. Estudos realizados mostram que quer o aumento de pontos de amostragem nos lotes, quer aumento da porção teste nas análises de quantificação de

microrganismos, levará a um crescimento aparente na contagem média das colónias (em log), no entanto levará a uma redução da variância, que por consequência, levará a uma redução da incerteza da medição, no processo em geral (52,67,68). Aumentado o número de amostras em análise, a precisão dos resultados também aumentará. Em 2010, já tinha sido realizado um estudo para tentativa de diminuição da variância entre duplicados de amostras através do aumento da porção teste ou de um processo de dupla homogeneização para a contagem das colónias. Concluíram que um aumento da porção teste iria diminuir a incerteza, sendo válido para um valor mínimo de 100 gramas. No entanto, para a realidade dos laboratórios de microbiologia como este, este aumento não seria comportável pela relação custo-benefício (68).

Tendo em conta estes pressupostos, será necessário a realização de uma nova análise, tendo em conta todas as fontes de variabilidade que poderão afetar o cálculo da incerteza, inserindo-as no contexto da análise. Só após estas fontes de variabilidade estarem a ser consideradas no cálculo, é que será possível uma análise de comparação dos valores obtidos quer pelos métodos da RELACRE, quer pela ISO 19036:2019.

Em 2007, uma estimativa foi realizada com o intuito de compreender e quantificar a extensão tanto da incerteza da amostragem como da análise. A incerteza total foi estimada em 18,6%. A incerteza da amostragem contribui para a incerteza total em 15,3%, enquanto a incerteza da análise foi de 10,8 % (49). De facto, estes valores são próximos dos obtidos neste estudo, no entanto, num estudo futuro será imprescindível uma análise mais detalhada para compreender as diferenças de valores para a incerteza de medição (análise) detetadas entre estes dois métodos e a ISO 19036:2019.

A cálculo An_{ANOVA} permite a comparação da variância entre amostras. Devido ao facto de que, para cada matriz alimentar só existir a análise de uma amostra, duas para a carcaça, não seria possível esta comparação. Para a possibilidade de cálculo da incerteza usando An_{ANOVA} , será imprescindível um aumento de amostras analisadas para cada matriz separadamente (67).

5. Conclusão

5.1. Estudo comparativo das normas

Após a análise de várias comparações, torna-se imperativo olhar para o panorama mais abrangente que nos permita tomar decisões que poderão significar a alteração/implementação da norma ou a manutenção da atual. Devido à implementação de um método interno pelo laboratório, é presumível que algumas das atualizações de informação que se verificou na norma ISO 17728, vieram colmatar e corrigir as lacunas detetadas previamente. No entanto, nem todas as lacunas poderão ter sido

corrigidas, podendo o laboratório manter o seu método interno, acrescentando estas melhorias sem mudar obrigatoriamente de norma.

Não havendo diretrizes que obriguem a implementação da norma neste momento, será do interesse do laboratório a continuação do estudo comparativo entre as normas, de forma a obter conclusões mais sólidas. Este prosseguimento do estudo deverá passar pela aplicação da comparação a um nível mais prático, ao nível da atuação da amostragem, de forma a verificar potenciais diferenças significativas, e o seu efeito benéfico para o processo de amostragem. Após esta comparação, o laboratório terá mais dados, baseando-se numa opinião mais fundamentada e sólida, tornando, a decisão posterior mais robusta.

A relevância da inclusão das empresas na partilha de atualizações e divulgação de normas tornou-se ainda mais exacerbada com a análise comparativa apresentada neste estudo.

Recentemente, foi divulgado que a norma ISO 7218 se encontra em revisão e que será substituída pela ISO/WD 7218, encontrando-se em fase preparatória, no estudo do esboço do trabalho (69). Esta substituição de norma, poderá trazer melhorias relativas à informação existente para a área das colheitas, e caso esta possibilidade se realize, a implementação da norma 17728 não será benéfica para o laboratório. Esta informação é fulcral na decisão final e não deverá ser negligenciada. Assim, seria oportuno por parte do laboratório decidir se a tomada de decisão é justificável e qual será o timing ideal, sabendo de antemão a existência de novas possibilidades porventura mais benéficas.

Concluindo, o laboratório poderá optar pelas decisões seguintes: 1) Manter a norma que está neste momento implementada, esperar para a publicação da norma que a irá substituir, ISO/WD 7218, e efetuar o estudo para perceber quais serão as melhorias implementadas (e se faz sentido a continuidade do método interno ou sua alteração); 2) A implementação da norma em estudo, a ISO/TS 17728:2015; 3) Aguardar pela publicação da ISO/WD 7218 e efetuar o estudo comparativo com a norma ISO/TS 17728:2015 de forma a analisar se as conclusões tiradas com o estudo efetuado serão as mesmas.

5.2. Cálculo das Incertezas

A amostragem é um processo fundamental na análise do lote e por consequência, na decisão de aceitar ou rejeitar o lote para consumo. Apesar de ainda haver uma falta de uniformização de métodos para o cálculo da incerteza de amostragem e do seu peso relativo, o seu cálculo é imperativo.

O objetivo da utilização destes métodos para o cálculo das incertezas era perceber qual seria o peso que a amostragem poderia ter na incerteza total da análise. Devido ao número baixo de amostras

analisadas para as restantes matrizes, só foi possível retirar conclusões para a matriz higiene de superfícies (zaragatoa).

Na matriz higiene de superfícies (zaragatoa), os valores de incerteza, tanto para a amostragem como para a análise, foram idênticos. Apesar de ser esperado um valor considerável para a incerteza da amostragem, este mesmo apresenta um peso idêntico ao da análise. No entanto, o valor da incerteza da medição obtido através do método ISO 19036:2019, não sendo concordante com os valores obtidos pelos métodos da Relacre, demonstra que será necessário um estudo contínuo, aumentando o valor de amostras a analisar. Através deste estudo, poderá ser possível a tendência do valor da incerteza e tentar a obtenção de conclusões.

Para a realização desta comparação, utilizando os três métodos de cálculo de incerteza, temos de ter em consideração todos os fatores de variabilidade que poderão afetar o valor final da incerteza e todos os predispostos dos métodos. O número de amostras a serem analisadas deverão ser, no mínimo dez amostras, baseando nos requisitos de análise da ISO 19036: 2019. No entanto, de modo a obter um maior grau de precisão dos valores obtidos, este número de amostras poderá ter de maior mediante a matriz que esteja em estudo. O número de técnicos a realizar a amostragem deverá ser em maior número, pelo menos o dobro. A amostragem deverá ser feita em dias diferentes e o meio de transporte a ser utilizado também deverá ser diferente. A análise em si, também deverá ser feita pelo maior número de técnicos possíveis e utilizar meios e materiais de laboratório diferentes. Inicialmente este estudo poderá ser feito para só uma matriz em estudo, e só após os cálculos realizados e já tendo valores, se poderá ponderar se estes dois métodos poderão ser ou não adaptados para contexto alimentar.

Será interessante em estudos futuros verificar o estudo do peso da variância na análise dos produtos processados em laboratório bem como se a alteração da quantidade da porção teste (desde que fosse para valores comportáveis para o laboratório) levará a uma alteração da variância. Outro estudo que poderá ser conduzido, será um estudo entre laboratórios de comparação de valores para a mesma matriz, de forma a aumentar o conhecimento sobre o peso da amostragem na incerteza total da análise e se este mesmo altera-se mediante o processo de amostragem escolhido.

6. Referências Bibliográficas

1. Empresa – Equilibrium [Internet]. [cited 2020 Oct 30]. Available from: <https://equilibrium.com.pt/empresa/>
2. World Health Organization. WHO | WHO estimates of the global burden of foodborne diseases short. Technical report. 2015.
3. EFSA, ECDC. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA J. 2019;17.
4. Bhaskar S V. Chapter 1 – Foodborne diseases—disease burden. In: Gupta RK, Dudeja, Singh Minhas BT-FS in the 21st C, editors. San Diego: Academic Press; 2017. p. 1–10.
5. Forsythe SJ. Microbiologia da segurança alimentar. Artmed. Artmed Editora; 2002.
6. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. Int J Food Microbiol. 2010;139:S3–15.
7. Codex. General Principles of Food Hygiene. Codex Aliment – Basic Texts Food Hyg. 2003;1–31.
8. Havelaar AH, Brul S, de Jong A, de Jonge R, Zwietering MH, ter Kuile BH. Future challenges to microbial food safety. Int J Food Microbiol. 2010 May 30;139(SUPPL. 1):S79–94.
9. Slifko TR, Smith H V, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int J Parasitol. 2000;
10. Viegas SJ. Alterações do estado de saúde associadas à alimentação – Contaminação microbiológica dos alimentos. INSA– Departamento de Alimentação e Nutrição. 2009.
11. Robertson A, Tirado C, Lobstein T, Jermini M, Knai C, Jensen JH, et al. Food and health in Europe: a new basis for action. WHO regional publications. European series. 2004.
12. Mensah L, Julien D. Implementation of food safety management systems in the UK. Food Control. 2011;22:1216–25.
13. Sousa C. Laboratórios de Microbiologia Alimentar– Os desafios atuais e futuros. 2012.
14. FAO, WHO, CODEX. Codex Strategic Plan 2020–2025. 2019.
15. WHO and FAO. Understanding CODEX. 2018. 52 p.
16. IQA. Os Microrganismos e os Alimentos. :7. Available from: http://www.epralima.com/iqa/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=70&Itemid=99
17. Parlamento Europeu e Conselho Europeu. Regulamento (CE) N.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e

- estabelece procedimentos em matéri. J Of das Comunidades Eur. 2002;L 31:1–24.
18. Parlamento Europeu e Conselho Europeu. Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. J Of da União Eur. 2004;L 139:1–54.
 19. Parlamento Europeu e Conselho Europeu. Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. J Of da União Eur. 2004;L 139:55–205.
 20. Parlamento Europeu e Conselho Europeu. Regulamento (CE) N.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. J Of da União Eur. 2004;L139:206–44.
 21. Parlamento Europeu e Conselho Europeu. Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. J Of da União Eur. 2005;L 338:1–26.
 22. Parlamento Europeu e Conselho Europeu. Regulamento (CE) N.º1441/2007 de 5 de dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. J Of da União Eur. 2007;322(1441):12–29.
 23. Attrey DP. Food safety in international food trade–imports and exports. In: Food Safety in the 21st Century: Public Health Perspective. Elsevier Inc.; 2017. p. 455–68.
 24. Jasson V, Jacxsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. Vol. 27, Food Microbiology. Academic Press; 2010. p. 710–30.
 25. Cocolin L, Rajkovic A, Rantsiou K, Uyttendaele M. The challenge of merging food safety diagnostic needs with quantitative PCR platforms. Trends Food Sci Technol. 2011;22.
 26. Lacasse D, Seixas P. Introdução à microbiologia alimentar. 1995.
 27. Fraqueza MJ. Métodos rápidos aplicados ao controlo microbiológico dos alimentos. 2002.
 28. AOAC International. How to meet ISO 17025 Requirements for Method Verification. 2008.
 29. Fortunato A. Gestão Da qualidade em laboratórios clínicos. 2011.
 30. Almeida J, Pires Â. Vantagens e dificuldades da implementação de um sistema da Qualidade num laboratório de ensaio e/ou calibração. 2006.
 31. Sierra S. Gestão da qualidade num laboratório com acreditação: Relatório de Estágio na Silliker Portugal, S.A. 2017.
 32. International Standards Organisation. Benefits of standards: the ISO materials [Internet]. Iso.

2017. 65 p. Available from: <https://www.iso.org/benefits-of-standards-the-iso-materials.html>
33. ISO. ISO in brief. 2019.
 34. IPAC [Internet]. [cited 2020 Oct 20]. Available from: http://www.ipac.pt/pesquisa/lista_lae.asp
 35. ISO. ISO 7218:2005 Amd 1:2013–Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations. ISO. 2013.
 36. ISO. ISO/TS 17728:2015 – Microbiology of the food chain – Sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples. 2015.
 37. Jongenburger I, den Besten HMW, Zwietering MH. Statistical Aspects of Food Safety Sampling. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2015 Apr 10;6(1):479–503.
 38. ICMSE. Micro-organisms in foods: 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and Specific Applications. Vol. 19, Blackwell Scientific Publications. Oxford, England; 1986. 315 p.
 39. FAO. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment. *FAO Agric Consum Prot.* 2007;63:68.
 40. Eurachem. EURACHEM / CITAC Guide Measurement uncertainty arising from sampling A guide to methods and approaches Second Edition. 2019.
 41. Gron C, Hansen JB, Magnusson B, Nordbotten A, Krysell M, Andersen KJ, et al. Uncertainty from sampling – A Nordtest handbook for sampling planners on sampling quality assurance and uncertainty estimation. Based upon the Eurachem International Guide Estimation of measurement uncertainty arising from sampling. 2007.
 42. RELACRE. Guia RELACRE 28: Amostragem de águas. 2017. p. 135.
 43. ISO. ISO 19036:2019 Microbiology of the food chain – Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. 2019. p. 38.
 44. Greenwood M, Roberts D. Practical Food Microbiology. Practical Food Microbiology. Blackwell Pub; 2003. 294 p.
 45. S L R Ellison and A Williams (Eds). Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third edition. 2012.
 46. Augustin J-C, Carlier V. Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts. Vol. 23, Food microbiology. Elsevier; 2006. p. 1–38.
 47. Corry JEL, Jarvis B, Passmore S, Hedges A. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. *Food Microbiol.* 2007;24(3):230–53.
 48. Jarvis B, Corry JEL, Hedges AJ. Estimates of measurement uncertainty from proficiency

- testing schemes, internal laboratory quality monitoring and during routine enforcement examination of foods. *J Appl Microbiol.* 2007;103(2):267–462.
49. Jarvis B, Hedges AJ, Corry JEL. Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: Comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts. *Int J Food Microbiol.* 2007;116(1):44–51.
 50. Reinders RD, De Jonge R, Evers EG. A statistical method to determine whether microorganisms are randomly distributed in a food matrix, applied to coliforms and *Escherichia coli* O157 in minced beef. *Food Microbiol.* 2003;20(3):297–303.
 51. Europe I. Impact of microbial distributions on food safety. ILSI Eur Rep Ser. 2010;
 52. Jarvis B, Hedges AJ. The effect of the number of sample units tested on the precision of microbial colony counts. Vol. 28, *Food Microbiology.* Food Microbiol; 2011.
 53. Jarvis B. Chapter 10 – Measurement uncertainty in microbiological analysis. In: Jarvis BBT-SA of the ME of F (Third E, editor. Academic Press; 2016. p. 185–94.
 54. Jarvis B. Chapter 4 – The distribution of microorganisms in foods in relation to sampling. In: Jarvis BBT-SA of the ME of F (Third E, editor. Academic Press; 2016. p. 47–70.
 55. Kilsby DC, Baird-Parker AC. Sampling programmes for the microbiological analysis of food. In: *Symposium series–Society for Applied Bacteriology.* 1983.
 56. Legan JD, Vandeven MH, Dahms S, Cole MB. Determining the concentration of microorganisms controlled by attributes sampling plans. *Food Control.* 2001;12(3):137–47.
 57. Jarvis B. *Statistical aspects of the microbiological examination of foods.* Academic Press; 2008.
 58. Gonzales-Barron U, Kerr M, Sheridan JJ, Butler F. Count data distributions and their zero-modified equivalents as a framework for modelling microbial data with a relatively high occurrence of zero counts. *Int J Food Microbiol.* 2010;136(3):268–77.
 59. Ramsey MH, Lyn J, Wood R. Optimised uncertainty at minimum overall cost to achieve fitness-for-purpose in food analysis. Electronic Supplementary Information available. See <http://www.rsc.org/suppdata/an/b1/b104285h>. *Analyst.* 2001;126(10):1777–83.
 60. Lyn JA, Ramsey MH, Wood R. Optimised uncertainty in food analysis: application and comparison between four contrasting ‘analyte–commodity’ combinations. *Analyst.* 2002;127(9):1252–60.
 61. Lyn JA, Ramsey MH, Wood R. Multi-analyte optimisation of uncertainty in infant food analysis. *Analyst.* 2003;128(4):379–88.
 62. Jarvis B, Hedges AJ, Corry JEL. The contribution of sampling uncertainty to total measurement uncertainty in the enumeration of microorganisms in foods. Vol. 30, *Food Microbiology.* Food Microbiol; 2012 Jun.

63. ISO. ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. Vol. 44. 2013. p. 1–15.
64. IPQ. NP 4405 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de microrganismos a 30°C. 2002;
65. Jarvis B. Chapter 11 – Estimation of measurement uncertainty. In: Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods: Third Edition. 2016. p. 195–227.
66. Elliott J. Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates. Freshw Biol Assoc Sci Publ. 1977;25:1–159.
67. Lyn JA, Ramsey MH, Coad DS, Damant AP, Wood R, Boon KA. The duplicate method of uncertainty estimation: Are eight targets enough? Vol. 132, Analyst. Royal Society of Chemistry; 2007.
68. Corry JEL, Jarvis B, Hedges AJ. Minimising the between-sample variance in colony counts on foods. Vol. 27, Food Microbiology. Food Microbiol; 2010. p. 598–603.
69. ISO. ISO/WD 7218 – Microbiology of the food chain – General requirements and guidance for microbiological examinations. ISO.

7. Anexo 1- Tabela de comparação entre as normas ISO 7218:2007 Amd 2013 e ISO/TS 17728:2015

Principais Diferenças	
ISO 7218:2007 Amd 2013	ISO/TS 17728:2015
<i>Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations</i>	<i>Microbiology of the food chain– Sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples</i>
Referências Normativas	
<p>Referido no capítulo 2 da norma;</p> <p>ISO 835, <i>Laboratory glassware– Graduated pipettes</i>;</p> <p>ISO 6887 (all parts), <i>Microbiology of food and animal feeding stuffs– Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilution for microbiological examinations</i>;</p> <p>ISO 8199, <i>Water quality– General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture</i>;</p> <p>ISO 8655 (all parts), <i>Piston-operated volumetric apparatus</i>;</p> <p>ISO 11133, <i>Microbiology of food and animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media</i>;</p> <p>ISO 16140-2, <i>Microbiology of food and animal feed – Method validation–Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method</i>;</p> <p>ISO 19036, <i>Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations</i>;</p> <p>ISO 22174, <i>Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions</i>;</p>	<p>Referido no capítulo 2 da norma;</p> <p>A anterior norma torna-se a base e, a única referência normativa;</p>
Âmbito/Enquadramento	
<p>Referido no capítulo 1;</p> <p>Fornecer os principais requisitos e guia para:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Implementação de normas dos comitês ISO/TC 34/SC 9 ou ISO/TC 34/SC 5 para detecção e enumeração dos microrganismos; -Boas práticas laboratoriais para laboratórios de microbiologia alimentar; - Orientação para a acreditação como laboratório de microbiologia alimentar; <p>Assegurar a validade das análises microbiológicas aos alimentos, ajudar na garantia de que as técnicas no seu geral que são utilizadas sejam as mesmas em todos os laboratórios, ajudar a alcançar resultados homogêneos nos diferentes</p>	<p>Referido no capítulo 1;</p> <p>Aplica-se à colheita de amostras antes da sua submissão ao laboratório para análise.</p> <p>Fornecer instruções gerais e requisitos específicos para a obtenção de amostras e o seu transporte para o laboratório;</p> <p>Aplica-se a todos os produtos alimentares e alimentos destinados a animais, estando incluídos produtos congelados, carcaças (excluindo a sua superfície), carne e produtos <i>bulk</i> (produtos a granel). No entanto, as seguintes amostras não estão incluídas no âmbito desta norma: leite e laticínios (ISO 707), amostragem da superfície de carcaças (ISO 17604), amostras provenientes de superfície ambientais (ISO 18593), amostras</p>

<p>laboratórios e contribuir para a segurança do pessoal presente no laboratório, evitando risco de infecção.</p> <p>Aplica-se à microbiologia dos alimentos, à dos alimentos destinada a animais, à de ambiente de produção alimentar e primária;</p>	<p>provenientes de ambiente de produção primária (ISO 13307);</p>
Premissas	
<p>Referido no capítulo 3;</p> <p>Detalhe dos requisitos gerais para o <i>design</i> de um laboratório microbiológico; Este <i>design</i> deverá ter em consideração as considerações de segurança tendo em conta as categorias de risco em que se encontram os microrganismos;</p> <p>É enumerado as áreas do laboratório, sendo estas, divididas em áreas associadas às amostras e análise (receção e armazenamento das amostras, preparação das amostras, análise das amostras, manipulação de presumíveis patogénicos, preparação e esterilização de meios de cultura e equipamento, armazenamento dos meios de cultura e reagentes, análise a alimentos para esterilização, descontaminação, lavagem do material de vidro e outros equipamentos, armazenamento de produtos químicos perigosos, de preferência em locais designados para tal) e áreas gerais (entradas, corredores, áreas administrativas, casas de banho, vestiários, salas de arquivo, sala de convívio). Menção da importância de estas terem de ser separadas;</p> <p>O objetivo do <i>design</i> deverá garantir um ambiente seguro onde as análises são realizadas de forma a não afetar a confiança dos resultados obtidos. Para isso, deverá ser evitado a contaminação cruzada através da construção do laboratório de acordo com o princípio de "sentido único", os procedimentos deverão ser feitos de forma sequencial, tendo em conta precauções para assegurar a integridade da análise e da amostra e separação das atividades no tempo e espaço;</p> <p>Enumeração das premissas que deverão ser seguidas para a construção e equipamento do laboratório de forma a reduzir o risco de contaminação por pó e por consequência, por microrganismos;</p> <p>Referência à desinfeção e limpeza do laboratório salientando pontos-chave que deverão ser verificados;</p>	<p>Não mencionado na norma;</p>
Termos e definições	
<p>Não mencionado na norma;</p>	<p>Referido no capítulo 3;</p> <p>Estão presentes nesta norma termos e definições estando categorizadas nos seguintes pontos:</p> <p>3.1.-Amostragem;</p> <p>3.2.-Amostras;</p>

	3.3.-Produtos; 3.4. -Manuseamento das amostras;
Pessoal	
<p>Referido no capítulo 4;</p> <p>Indicação da ISO/IEC 17025 para os requisitos gerais das competências;</p> <p>Menção à definição de critérios de avaliação de competências para cada método ou técnica utilizada. Reforço da necessidade contínua da verificação das competências do pessoal, sendo mencionado que esta poderá ser feita através de programas de controlo de qualidade interna, uso de material de referência, testes de proficiência ou de através de testes de <i>self-assessment</i> para a enumeração de microrganismos tal como descrito na ISO 1446-2;</p> <p>Listagem das precauções de higiene que deverá ser seguida pelo pessoal presente no laboratório de forma a evitar contaminação quer das amostras, quer dos meios de cultura e de forma a diminuir o risco de infeção para o pessoal no laboratório;</p>	<p>Referido no capítulo 6;</p> <p>Às partes envolvidas ou seus representantes, deverá ser dada a oportunidade de estarem presentes aquando da realização da amostragem;</p> <p>Sempre que haja requisitos específicos para a amostragem ou para um teste específico, estes devem ser seguidos;</p> <p>A amostragem para exames microbiológicos deve ser realizada sempre com pessoal treinado e experiente;</p> <p>Devem estar cientes dos requisitos necessários a aplicar no sentido de minimizar alterações na flora microbiana dos produtos durante amostragem e transporte;</p>
Princípios e requisitos gerais	
<p>Referido no subcapítulo 8.1.1;</p> <p>A informação fornecida neste ponto foi distribuída por vários pontos na nova norma sendo esta mais detalhada;</p>	<p>Referido no capítulo 4;</p> <p>Antes da amostragem devem ser acordado vários detalhes como instruções sobre montagem e composição no local, o tipo de produto, a quantidade mínima necessária para análise e o material e instrumentos necessários na amostragem e a finalidade da análise;</p> <p>Critério de aceitação das amostras e desvios permitidos aquando da receção no laboratório deverão ser definidos em conformidade com o cliente;</p>
<p>Semelhanças: Salienta a importância da preservação da integridade da amostra desde a sua colheita até à sua entrega no laboratório, sendo esta também, uma amostra representativa do lote ou do produto em análise.</p>	
Equipamento e utensílios	
<p>Referido no capítulo 5;</p> <p>Referenciados vários equipamentos e utensílios usados num laboratório de microbiologia, qual a sua utilidade, manuseamento, limpeza e desinfeção, manutenção e se necessário, calibração;</p>	<p>Referido no ponto 7.1; 7.2; 7.3 e 10.1;</p> <p>Nestes pontos são referenciados equipamentos que podem ser necessários para a amostragem. É detalhado para cada tipo de produto que seja amostrado quais os utensílios e equipamentos necessários e também quais são os utilizados no transporte de amostras;</p>
Plano de amostragem	
<p>Não faz parte desta norma;</p>	<p>Referido no capítulo 5;</p>

	<p>Apesar de na secção "Âmbito", esta referir que os planos de amostragem não fazem parte da norma, algumas informações são descritas, nomeadamente sobre a amostragem de produtos <i>bulk (produtos a granel)</i>;</p> <p>Ao ser feito a amostragem de produtos <i>bulk (produtos a granel)</i>, os locais para a realização de incrementos, devem ser incluídos no plano de amostragem. Todas as partes interessadas devem estar de acordo com o plano de amostragem a ser usado. Da mesma forma, devem estar de acordo com o tamanho dos incrementos para as amostras poderem ser reunidas antes do teste.</p> <p>Este ponto faz referência à série ISO 2859 para a obtenção de mais informação acerca do plano de amostragem;</p>
Preparação do material de laboratório	
<p>Referido no capítulo 6 na norma;</p> <p>Referência à importância da preparação dos materiais de forma a manter a limpeza e a esterilização.</p> <p>Enumeração das formas de esterilização e descontaminação possíveis para o material de laboratório.</p> <p>Menção à lavagem de material e de armazenamento do material;</p>	<p>Não existe um ponto específico para a preparação do material de laboratório nesta norma, mas existe sim, referência ao material a usar para a descontaminação de embalagens, de instrumentos e de superfícies de amostras no ponto 7.1.1;</p>
Preparação e esterilização de meios de cultura	
<p>Referido no capítulo 7;</p> <p>Seguir as indicações da ISO 11133;</p>	<p>Não mencionado na norma;</p>
Técnicas de Amostragem	
<p>Não mencionado na norma;</p>	<p>Referido no capítulo 7;</p> <p>Enumeração do material usado para a amostragem. Indicação do material que se pode utilizar para descontaminação de embalagens, instrumentos e superfícies de amostras;</p> <p>Orientação do protocolo geral das técnicas de amostragem.</p> <p>A amostragem de produtos de maiores dimensões poderá ser feita na fábrica ou estes podem ser transportada para o laboratório.</p> <p>Há a descrição dos procedimentos para a colheita de amostra por grupo de produtos: <i>bulk (produtos a granel)</i>, empacotado, refrigerado, produtos congelado separadamente, blocos de produto congelado, à temperatura ambiente, quentes, porções consumidas em restaurantes, marisco, frutas, vegetais, ovos, comida enlatada, comida estragada e amostras que são retiradas diretamente da linha de produção. Descrito o tipo de produto dentro de cada grupo, o equipamento e o procedimento específico;</p>

Semelhanças: Referência à norma ISO 6887 para a preparação da porção teste;	
Embalamento e rotulagem	
<p>Referido na norma no subcapítulo 8.1.1 e 8.2;</p> <p>Menções nestes dois pontos de informação sobre o embalamento da amostra e de rotulagem;</p>	<p>Referido no capítulo 8;</p> <p>O embalamento das amostras deverá feito com material próprio de força a proteger a amostra contra quebras ou dano do <i>shipping seals</i>. Estes selos poderão ser requisitados pelo cliente com o objetivo de garantir a não adulteração das amostras durante a amostragem e análise;</p>
Semelhanças: A informação base para o embalamento e rotulagem é a mesma;	
Transporte	
<p>Referido na norma no subcapítulo 8.2;</p>	<p>Referido na norma no capítulo 10;</p> <p>O transporte para o laboratório deve ser realizado mais rapidamente possível, nunca excedendo as 24h, e em ambientes com temperatura controlada de forma a garantir a integridade da amostra. Adicionada uma nova temperatura para o transporte, de produtos refrigerados (abaixo de 8°C); Todas as medidas tomadas para garantir a integridade da amostra devem ser documentadas.</p> <p>Adicionada informação relativamente ao marisco vivo, sendo que a sua temperatura deverá ser registada imediatamente após a sua colheita. A temperatura durante o seu transporte deverá estar dentro da gama de temperatura entre 0°C e 10°C e o equipamento utilizado para o seu transporte deverá atingir estas temperaturas dentro das 4 horas após a colheita da amostra e deverá ser capaz de a manter por 24. Este ponto faz menção à série ISO 6887-3 para mais informações;</p> <p>Durante o transporte deve ser colocado um <i>data recorder</i> calibrado entre as amostras;</p> <p>Referência ao protocolo de transporte: O transporte das amostras, quando a amostragem é organizada pelo laboratório, poderá ser transportada pelo pessoal da amostragem, usando equipamento do próprio laboratório ou por um subcontratado. Em outros casos, as condições de transporte são da responsabilidade do pessoal da amostragem e/ou do cliente após discussão com o laboratório onde é discutido os métodos mais adequados para transporte e entrega das amostras. O protocolo de transporte deverá ter em conta fatores críticos tais como a duração do transporte, a natureza das amostras, os métodos utilizados para o registo da temperatura (antes, durante o transporte e momento de receção), o embalamento e o arranjo das amostras de forma a evitar a mistura de amostras com diferentes temperaturas de transporte (ex: amostras quentes e congeladas);</p>

	<p>Algumas amostras altamente perecíveis por tempos e transporte superiores a 24 horas, sendo que os efeitos deverão ser primeiramente verificados.</p> <p><u>Transporte pelo laboratório:</u> Se o veículo do laboratório for refrigerado ou se possuir uma unidade de refrigeração, esta deverá ser usada para o transporte das amostras. Esta unidade deverá estar ligada anteriormente o tempo suficiente de forma a atingir a temperatura requerida para o transporte. Caso esta unidade não estiver disponível, as amostras deverão ser mantidas nas arcas refrigeradas e à sombra para ser minimizado o aumento da temperatura durante a viagem. O intervalo de valores da temperatura permitida durante o transporte e a duração máxima deste deve ser documentada no contrato com o cliente. Este intervalo dependerá do tipo de produto (refrigerado, ambiente, congelado) e deverá estar relacionada com a duração do transporte. Deverá haver um registo da temperatura das amostras ao longo do transporte, e se não possível, deverá ser verificado a temperatura sempre que seja aberta a arca onde estão transportadas e na sua receção pelo laboratório. Alguns produtos estáveis à temperatura ambiente não requerem refrigeração, no entanto, perante temperaturas altas, estas deverão ser registadas para futura compreensão do papel destas na implicação da preservação das amostras;</p> <p><u>Transporte por um subcontratado:</u> Quando o transporte não pode ser realizado pelo laboratório, este pode recorrer a uma transportadora. Esta mesma, deverá ser um veículo com refrigeração. As condições de transporte deverão ser cuidadosamente documentadas e acordadas de antes da contratação. Tal como o transporte feito pelo laboratório, a temperatura deverá ser monitorizada durante o transporte com o objetivo de registar a temperatura máxima atingida. Caso não seja possível, deverá ser registada a temperatura dentro da arca de transporte mesmo antes de fechar e a de novo, logo na chegada ao laboratório para garantir que a temperatura máxima permitida não foi excedida. Deverá ser feito o registo temporal da entrega da amostra ao subcontratada tal como aquando da sua receção pelo laboratório.</p>
<p>Semelhanças: Informação base para o transporte das amostras é a mesma;</p>	
<p>Receção e armazenamento das amostras</p>	
<p>Receção está referida no subcapítulo 8.3; Armazenamento referido no subcapítulo 8.4;</p>	<p>Ambos referidos no capítulo 11 da norma; Os critérios de aceitação da amostra devem ser acordados com o cliente (ex: temperatura, tamanho e embalagem das amostras) e na receção da</p>

	<p>amostra no laboratório deve ser verificado se a mesma cumpre os requisitos acordados;</p> <p>À receção das amostras pelo laboratório, a temperatura da amostra, ou a arca que a contém, deverá ser registada. Caso haja um registo de temperaturas durante o transporte, este deve ser transferido;</p>
<p>Semelhanças: Informação base para a receção e armazenamento das amostras é a mesma;</p>	
<p>Análise</p>	
<p>Referido no capítulo 9;</p> <p>Ênfase às precauções higiénicas durante a análise de forma a evitar contaminação das amostras (quer pelo ambiente de trabalho quer pelo analista) e manter as condições de assepsia. Referência à preparação da suspensão inicial e diluições, de acordo com a ISO 6887;</p>	<p>Não mencionado na norma;</p>
<p>Preparação do <i>report</i> de amostragem</p>	
<p>Não mencionado na norma;</p>	<p>Referido no capítulo 9;</p> <p>As amostras devem ser acompanhadas por um relatório num <i>report</i> padrão fornecido pelo laboratório e assinado pelo pessoal da amostragem, que deve conter a seguinte informação: Local, data e hora da amostragem, a natureza da amostra, número de amostras e sua identificação, qual o objetivo da amostragem e quais os microrganismos a serem pesquisados;</p> <p>Quando apropriado, deve incluir informação relevante relacionada com o produto alvo da análise (ex: dificuldade na obtenção de amostras representativas);</p> <p>Em adição a este relatório, deverá ser registados as seguintes informações e enviadas para o laboratório para identificação das amostras aquando da sua receção: tipo/nome do produto, descrição da amostra, número de amostras submetidas, local da amostragem ou colheita, nº do lote ou qualquer identificação do produto, nome do pessoal da amostragem, temperatura da amostra e seu armazenamento, testes requisitados;</p>
<p>Semelhanças: Informação a reter na receção das amostras igual (identificação temporal da amostragem, nome e morada do cliente)</p>	
<p>Enumeração</p>	
<p>Referido na norma no capítulo 10;</p> <p>Referidos os métodos utilizados para a enumeração de microrganismos presentes na amostra, sendo que nesta norma fazem só referência aos métodos que utilizem meios sólidos ou líquidos;</p>	<p>Não mencionado na norma;</p>
<p>Método de deteção (método qualitativo)</p>	
<p>Referido na norma no capítulo 11;</p>	<p>Não mencionado na norma;</p>

<p>Descrito o princípio do método, sendo o seu objetivo a determinação da presença/ausência de certos microrganismos numa quantidade de produto; É ainda mencionado que para a estimativa das medidas de incerteza da determinação qualitativa estão a ser investigadas pela comissão ISO/TC 34/SC 9.</p>	
Método de confirmação	
<p>Referido na norma no capítulo 12;</p> <p>Enumeração de vários métodos, começando pela coloração Gram (técnica de Hucker modificada), sendo feito a descrição das soluções usadas, modo de preparação das soluções, a técnica de coloração e interpretação dos resultados. É de igual forma mencionado as galerias bioquímicas, sondas nucleotídicas e métodos serológicos;</p>	<p>Não mencionado na norma;</p>
Relatório da análise	
<p>Referido na norma no capítulo 13;</p> <p>Descrição das informações que o relatório deverá ter incluído: método utilizado, temperatura de incubação e se necessário os resultados obtidos. Deverá ser incluído no relatório quaisquer detalhes operacionais que não estão incluídos nesta norma, tal como detalhes de incidentes ocorridos que possam influenciar os resultados. Se necessário a realização de testes por um laboratório de referência, e se já realizados, deverá ser mencionado. Deverá ser incluída toda a informação necessária para uma completa identificação da amostra, da mesma forma, a informação para a interpretação dos resultados;</p>	<p>Não mencionado na norma;</p>
Validação dos métodos microbiológicos	
<p>Referido na norma no capítulo 14;</p> <p>A informação é dividida em categorias (métodos de referência, métodos alternativos e métodos internos), sendo que o único que não está a ser investigado pela comissão ISO/TC 34/SC 9, será os alternativos onde é referido a ISO 16140;</p>	<p>Não mencionado na norma;</p>
Garantia da qualidade dos resultados/controlo de qualidade do desempenho	
<p>Referido na norma no capítulo 15;</p> <p>Dado a definição de controlo interno e qual o seu principal objetivo. Menção de uma periódica verificação é necessária para demonstração da variabilidade (entre analistas, equipamento e materiais) está sob controlo. Esta verificação poderá ser feita através do uso de materiais de referência, replicação de testes, entre outros;</p> <p>Referência à ISO 11133 para a manutenção das estirpes de referência;</p> <p>Menção à importância de os laboratórios participarem em testes de proficiência para o seu âmbito de atividade.</p>	<p>Não mencionado na norma;</p>

<p>A avaliação externa de qualidade deverá ser usada pelos laboratórios de forma a verificar a validade do seu sistema de qualidade no seu geral;</p>	
Anexos	
<p>Anexo A: Propriedades de alguns desinfetantes; Anexo B: Intervalo de confiança para técnicas e contagem de colónias; Anexo C: Determinação do número mais provável; Anexo D: Contagem de colónias <i>two dishes per dilution</i>;</p>	<p>Anexo A- Fluxograma das amostras Anexo B- Método de amostragem para peças ou blocos de gelo;</p>

7.1. Anexo 2 :Cálculo da incerteza da medição (análise) usando o método ISO 19036:2019 para as amostras zaragatoa

Comparação de medição do cálculo da incerteza de medição entre RELACRE e Iso 19036:2019												
Amostra	laboratório	porção teste	fator de diluição (D) e contagem (C)				total colo	total ufc	log	média	def da med	g.l (n-1)
			d1	c1	d2	c2						
1	a		0	66	1	6	72	65	1,81594		0,0213	
1	b		0	72	1	7	79	72	1,856234	1,96203	0,0112	3
1	c		0	112	1	14	126	115	2,058978		0,0094	
1	d		0	134	1	10	144	131	2,11697		0,0240	
2	a		0	20	1	0	20	18	1,259637		0,0000	
2	b		0	22	1	0	22	20	1,30103	1,263843	0,0014	3
2	c		0	18	1	0	18	16	1,21388		0,0025	
2	d		0	21	1	0	21	19	1,280827		0,0003	
3	a		0	35	1	0	35	32	1,502675		0,0000	
3	b		0	31	1	0	31	28	1,449969	1,498101	0,0023	3
3	c		0	34	1	0	34	31	1,490086		0,0001	
3	d		0	39	1	0	39	35	1,549672		0,0027	
4	a		0	16	1	0	16	15	1,162727		0,0000	
4	b		0	18	1	0	18	16	1,21388	1,1676	0,0021	3
4	c		0	17	1	0	17	15	1,189056		0,0005	
4	d		0	14	1	0	14	13	1,104735		0,0040	
5	a		0	16	1	0	16	15	1,162727		0,0033	
5	b		0	21	1	0	21	19	1,280827	1,219821	0,0037	3
5	c		0	22	1	0	22	20	1,30103		0,0066	
5	d		0	15	1	0	15	14	1,134699		0,0072	
6	a		0	55	1	2	57	52	1,714482		0,0018	
6	b		0	61	1	1	62	56	1,750999	1,671797	0,0063	3
6	c		0	42	1	0	42	38	1,581857		0,0081	
6	d		0	48	1	0	48	44	1,639849		0,0010	
7	a		0	185	1	12	197	179	2,253074		0,0000	
7	b		0	172	1	10	182	165	2,218679	2,249229	0,0009	3
7	c		0	179	1	15	194	176	2,246409		0,0000	
7	d		0	188	1	21	209	190	2,278754		0,0009	
8	a		0	105	1	14	119	108	2,034154		0,0034	
8	b		0	119	1	18	137	125	2,095328	2,092889	0,0000	3
8	c		0	131	1	21	152	138	2,140451		0,0023	
8	d		0	120	1	19	139	126	2,101622		0,0001	
9	a		0	95	1	5	100	91	1,958607		0,0015	
9	b		0	90	1	4	94	85	1,931735	1,997422	0,0043	3
9	c		0	105	1	12	117	106	2,026793		0,0009	
9	d		0	121	1	9	130	118	2,072551		0,0056	
10	a		0	195	1	13	208	189	2,276671		0,0001	
10	b		0	201	1	15	216	196	2,293061	2,265591	0,0008	3
10	c		0	180	1	18	198	180	2,255273		0,0001	
10	d		0	175	1	15	190	173	2,237361		0,0008	
11	a		0	134	1	9	143	130	2,113943		0,0005	
11	b		0	159	1	8	167	152	2,181324	2,13579	0,0021	3
11	c		0	122	1	11	133	121	2,082459		0,0028	
11	d		0	147	1	14	161	146	2,165433		0,0009	
12	a		0	68	1	5	73	66	1,82193		0,0007	
12	b		0	74	1	2	76	69	1,839421	1,795048	0,0020	3
12	c		0	52	1	2	54	49	1,691001		0,0108	
12	d		0	70	1	4	74	67	1,827839		0,0011	
13	a		0	89	1	10	99	90	1,954243		0,0009	
13	b		0	97	1	11	108	98	1,992031	1,923999	0,0046	3
13	c		0	80	1	5	85	77	1,888026		0,0013	
13	d		0	75	1	5	80	73	1,861697		0,0039	
										soma	0,1731077	39
											0,0044	
										Desvio pa	0,066623254	3,7