

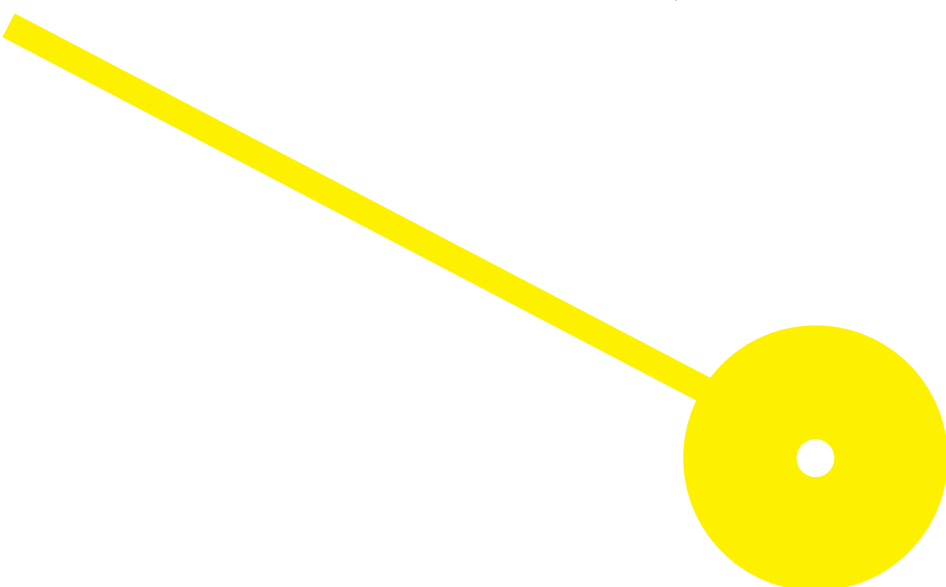


Validação secundária do método ISO 21527-2:2008

Auditoria ao método ISO 10718:2015

Catarina Alexandra Mendes Ferreira

10/2022





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Validação secundária ao método ISO 21527-2:2008

Auditoria ao método ISO 10718:2015

Autor

Catarina Alexandra Mendes Ferreira

Orientador(es)

Dr. Bruno Loureiro, Silliker Portugal, S.A.

Dra. Patrícia Costa, Silliker Portugal, S.A

Doutora Mónica Vieira, Professora Coordenadora do Mestrado em Bioquímica e Saúde da Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica em Saúde – Ramo Bioquímica Aplicada** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

O culminar de mais uma etapa da minha vida académica, profissional e pessoal, traz consigo um misto de emoções diferenciadas, muito relacionadas com todas as fases que vivenciei ao longo da concretização deste projeto. Desta forma, e porque estiveram sempre ao meu lado, não poderia deixar de manifestar o meu agradecimento.

Em primeiro à Silliker Portugal S.A, por me permitir evoluir dando-me a oportunidade de desenvolver este trabalho no Departamento de Microbiologia. Não posso deixar de salientar a Dr.^a Patrícia Costa e ao Dr. Bruno Loureiro, por todo o apoio, disponibilidade, compreensão e ajuda. De uma forma geral devo, igualmente, um agradecimento a todos os meus colegas de departamento que me apoiaram, eficazmente, ao longo deste último ano.

Em segundo lugar à Prof.^a. Dr.^a Mónica Vieira, primariamente por me ter aceite como sua orientanda e, conseqüentemente, pelo apoio ao longo deste tempo.

À minha equipa do Instituto Português de Oncologia do Porto, pelo incentivo constante, pelo apoio incondicional, pela empatia, pela paciência, principalmente em dias menos positivos, e pela total disponibilidade que demonstraram tendo em conta as minhas necessidades. Vocês são, indubitavelmente, dos principais responsáveis que me fizeram iniciar esta jornada.

Por último, e não menos importante, à minha família. Aqueles, que do meu jeito particular, sabem, que lá no fundo, vos agradeço. Nunca me “cortaram as asas” e estiveram lá quando eu mais precisei... à minha maneira, e vocês sabem, agradeço.

Este caminho não foi fácil, pois como já dizia *Stubby Currence* “o único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.” A todos, por tudo e muito mais, o meu profundo obrigado!

Resumo

O desenvolvimento industrial acelerado, como resposta ao aumento desenfreado da procura, potencia uma suscetibilidade acrescida a doenças alimentares com etiologia em alimentos contaminados. As análises microbiológicas a produtos para consumo humano são preponderantes como estratégias preventivas, assegurando que alimentos potencialmente contaminados não se disseminem no mercado e afetem a saúde da população.

Os objetivos do presente trabalho consistem em validar o método normativo ISO 21527-2:2008; executar auditoria técnica ao método ISO 10718:2015 e averiguar se os pressupostos das normas estão a ser cumpridos no laboratório.

A metodologia foi subdividida em duas partes. Na primeira foram testadas 54 amostras, preparadas em condições de precisão intermédia, e executados um total de 208 ensaios, com o intuito de avaliar o desempenho do método. A segunda parte consistiu na execução de uma auditoria, para averiguar se os pressupostos estão a ser cumpridos, e conseqüentemente, a deteção de não conformidades.

Os dados obtidos demonstram resultados satisfatórios que atestam os pressupostos em estudo, o que pressupõe que o método cumpriu os requisitos definidos para o uso específico, ou seja, o laboratório denota capacidade para executar o método de forma competente, o que origina resultados confiáveis. No que concerne à auditoria técnica, foram detetadas não conformidades, que perante ações corretivas, permitirá o processo de acreditação do método.

Palavras-chave: controlo de qualidade; validação de métodos; auditoria; acreditação

Abstract

The accelerated industrial development, as a response to the unrestrained increase in demand, potentiates an increased susceptibility to foodborne diseases with etiology in contaminated food. Microbiological analysis of products for human consumption are preponderant as preventive strategies, ensuring that potentially contaminated foods do not spread in the market and affect the health of the population.

The objectives of this work are to Validate the ISO 21527-2:2008 standard method; to perform a technical audit of the ISO 10718:2015 method and ascertain whether the assumptions of the standards are being met in the laboratory.

The methodology was divided into two parts. In the first part, 54 samples, prepared under intermediate precision conditions, were tested and a total of 208 tests were performed, in order to evaluate the performance of the method. The second part was the execution of an audit to verify if the assumptions are being met and consequently, the detection of any non-conformance.

The data obtained show satisfactory results that attest to the assumptions under study, which presupposes that the method has met the requirements defined for the specific use, i.e., the laboratory denotes the ability to competently perform the method, which leads to reliability. Regarding the technical audit, non-conformities were detected and the respective corrective actions will be the starting point for the method accreditation process.

Keywords: quality control; method validation; audit; accreditation

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Silliker Portugal, S.A. | 3 |
| 3. Objetivos | 4 |
| 4. Sistema de Gestão da Qualidade | 4 |
| 5. Acreditação | 6 |
| 6. Validação | 10 |
| 6.1. Precisão | 12 |
| 6.2. Estimativa da incerteza | 13 |
| 6.3. Exatidão | 15 |
| 6.4. Carta de amplitudes ou duplicados | 16 |
| 6.5. Parâmetros de desempenho do método | 17 |
| 7. Auditoria | 18 |
| 8. Os fungos na Indústria Alimentar | 20 |
| 8.1. ISO 21527.2:2008 | 22 |
| 9. Vinicultura | 24 |
| 9.1. ISO 10718:2015 | 28 |
| 10. Metodologia | 30 |
| 11. Resultados e Discussão | 32 |
| 11.1. Validação do Método | 32 |
| 11.1.1. Cálculo Precisão Intermédia | 32 |
| 11.1.2. Incertezas | 33 |
| 11.1.3. Exatidão | 34 |
| 11.1.4. Carta de amplitudes | 35 |
| 11.1.5. Características de desempenho | 36 |
| 11.2. Auditoria Técnica | 39 |
| 12. Conclusão | 41 |
| 13. Bibliografia | 43 |
| 14. Anexos | 48 |
| 14.1. Anexo I | 48 |

Abreviaturas

C – Conforme

CP – Critério de Precisão

DG18 – Dichloran Glycerol Agar

EA – *European Cooperation for Accreditation*

HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Points*

IAF – *International Accreditation Forum*

IEC – *International Electrotechnical Commission*

ILAC – *International Laboratory Accreditation Cooperation*

IPAC – Instituto Português de Acreditação

ISO – *International Organization for Standardization*

NA – Não aplicável

NC – Não conforme

NF – Norma francesa

NP – Norma portuguesa

PCC – Pontos Críticos de Controlo

SG – Sistema de Gestão

SGQ – Sistema de Gestão da Qualidade

S_R – Desvio padrão de reprodutibilidade

ufc – unidade formadora de colónias

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela I – Princípios do Sistema HACCP | 2 |
| Tabela II – Processo de Atribuição de Acreditação..... | 8 |
| Tabela III – Protocolo de Validação da Silliker S.A. para alimentos..... | 12 |
| Tabela IV – Parâmetros de desempenho de um método | 17 |
| Tabela V –Atividade da água conforme as matrizes..... | 23 |
| Tabela VI – Reagentes e meios de cultura da ISO 10718:2015..... | 29 |
| Tabela VII – Dados para o cálculo do desvio padrão de reprodutibilidade para bolores xerófilos | 32 |
| Tabela VIII – Dados para o cálculo do desvio padrão de reprodutibilidade para leveduras osmófilas .. | 33 |
| Tabela IX – Cálculo do desvio padrão relativo | 33 |
| Tabela X – Estimativa da incerteza para bolores xerófilos e leveduras osmófilas..... | 34 |
| Tabela XI – Valores de "z-score" resultantes do ensaio interlaboratorial..... | 34 |
| Tabela XII – Dados para o cálculo dos parâmetros de desempenho da ISO 21527-2:2008 | 36 |
| Tabela XIII – Relatório de Auditoria..... | 39 |

Índice de Quadros

| | |
|---|----|
| Quadro I – Definição de repetibilidade e reprodutibilidade..... | 12 |
| Quadro II – Definição de incerteza..... | 13 |

Índice de Imagens

| | |
|---|----|
| Imagem 1 – Abordagem global da incerteza..... | 14 |
| Imagem 2 – Intervalo de estimativa da incerteza..... | 15 |
| Imagem 3 – Esquema representativo da avaliação da exatidão por "z-score"..... | 15 |
| Imagem 4 – Carta de Amplitudes ou de Duplicados..... | 16 |
| Imagem 5 – Desafios e soluções perante contaminação por fungos..... | 21 |
| Imagem 6 – Fluxograma da ISO 21527-2:2008 | 23 |
| Imagem 7 – Fluxograma da ISO 10718:2015. | 28 |
| Imagem 8 – Colónias típicas de bolores no meio MGreen | 29 |
| Imagem 9 – Colónias típicas de bactérias no meio WLD..... | 29 |
| Imagem 10 – Metodologia de Precisão Intermédia | 30 |

Índice de Gráficos

| | |
|---|----|
| Gráfico I – Carta de amplitudes de bolores xerófilos..... | 35 |
| Gráfico II – Carta de amplitudes para leveduras osmófilas | 35 |

1.Introdução

A realidade do quotidiano laboral aponta para um mundo em crescimento, cada vez mais competitivo. As empresas adotam estratégias e medidas potenciadoras com intuito de projetarem a sua marca na tentativa de se demarcarem das restantes que possam, igualmente, oferecer serviços na mesma área de atuação. Para Kritikos (2014), empreendedores inovadores são vitais não só para a competitividade económica como para o desenvolvimento de oportunidades de emprego. Porém só conseguem atingir patamares superiores se forem recetivos à constante inovação. De facto, a competitividade é uma realidade cada vez mais distinta entre as empresas mundiais. A taxa de oferta, habitualmente, atinge percentagens superiores à procura e a qualidade, a confiança e os resultados sobressaem no momento da afirmação de novas parcerias entre potenciais clientes e empresas. É certo que as firmas devem-se reger de acordo com as leis governamentais de cada país e respeitar normas estabelecidas por esses mesmos organismos. Contudo os empreendedores são capazes de introduzir tecnologias inovadoras, novos produtos e novos serviços, potenciando a economia interna de uma sociedade e criando oportunidades de trabalho de curto e longo termo. (1,2)

A sociedade, comparativamente com décadas passadas, aumentou os seus níveis de educação e literacia e, deste modo, tornou-se mais exigente no que respeita à qualidade dos produtos para uso próprio ou consumo. Uma empresa focada na qualidade promove uma cultura que resulta em atitudes, comportamentos, ações e processos que valorizam as necessidades e visam a satisfação dos clientes, uma vez que a qualidade dos serviços e produtos inclui, igualmente, a perceção do valor e benefício para o cliente. (1,2)

Os sistemas de gestão de qualidade compreendem variáveis através das quais as empresas identificam os seus objetivos e definem os processos, e os recursos, para alcançar os resultados desejados. Os conceitos e os princípios que definem a gestão da qualidade capacitam as instituições para os desafios que enfrentam no dia-a-dia, incutindo medidas rigorosas imprescindíveis que visam garantir os padrões essenciais de um dado producto. (3,4,5,6)

Para a Silliker Portugal, S.A. o controlo de qualidade visa estabelecer políticas e procedimentos de trabalho que visem assegurar a qualidade do serviço prestado, garantindo que todos os ensaios realizados sejam sempre executados de acordo com os métodos estabelecidos, com os requisitos dos clientes e segundo o referencial normativo ISO/IEC 17025:2017¹.

A ISO/IEC 17025:2017 intitulada "*General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*"² foi desenvolvida com o objetivo de promover a confiança no funcionamento dos laboratórios, através de requisitos que demonstrem que estes operam de forma competente, imparcial, consistente e que denotam capacidade em gerar resultados

¹Também designada por ISO 17025 neste documento.

²Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.

válidos. As empresas devem-se basear nesta norma internacional para planejar e implementar intervenções que estabeleçam uma base para aumentar a eficácia do sistema de gestão, com o intuito de alcançar melhores resultados e diminuir os efeitos negativos dos diversos procedimentos. Por sua vez, clientes, parceiros e autoridades reguladores podem reconhecer a competência de um dado laboratório pela utilização da norma citada. (7,8)

A União Europeia (2004) refere que um dos objetivos fundamentais da legislação alimentar visa a procura de um nível eficaz de proteção da vida e da saúde humana. Qualquer empresa do sector alimentar que se dedique a processos de produção, transformação, armazenamento e distribuição de géneros alimentícios deve adotar o sistema *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP) ou em português Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos. O sistema HACCP pode ser definido como um conjunto de princípios técnico-científicos, sistemáticos, que abrangem a identificação, avaliação e controlo de riscos biológicos, químicos e físicos ao longo da cadeia de produção de alimentos, evitando potenciais inconformidades que podem resultar em dano para o consumidor, de forma a garantir que não estejam à disposição alimentos não seguros. Vários autores citam o *Codex Alimentarius* para determinar os sete princípios fundamentais para a aplicação de um sistema HACCP (Tabela I). (9,10,11,12,13)

Tabela I – Princípios do Sistema HACCP

| Princípios do Sistema HACCP | |
|--|--|
| I – Identificar os perigos e medidas preventivas | Identificar variáveis que possam ser evitadas, eliminadas ou reduzidas para níveis aceitáveis. |
| II – Determinar os pontos críticos de controlo (PCC) | Identificar os PCC nas fases em que o controlo é imprescindível para eliminar um dado risco ou reduzi-lo para valores satisfatórios. |
| III – Estabelecer limites críticos para cada PCC | Limites que separam a aceitabilidade da inconformidade. |
| IV – Monitorizar/controlar cada PCC | Estabelecer e aplicar processos eficazes de vigilância. |
| V – Estabelecer medidas corretivas | Quando a vigilância define que um PC não se encontra sob controlo. |
| VI – Estabelecer procedimentos de verificação | Processos regulares a efetuar de forma a garantir eficácia dos pontos anteriores. |
| VII – Criação de registo e documentação | Elaboração de sistemas de documentos e registos adequados. |

Cada empresa é responsável pelo cumprimento dos princípios do sistema, devendo adotar uma posição flexível de modo a que este possa ser aplicável em todas as situações. Contudo o HACCP, dado a sua complexidade, denota limitações, nomeadamente no que concerne às pequenas e médias empresas. A falta de tempo, recursos financeiros e pessoal especializado pode promover uma quebra de relação entre as normas, o que resulta numa alteração da conformidade dos pressupostos do sistema. Contudo de forma a prevenir, ou em determinados

casos eliminar ou reduzir os perigos, devem ser tidos em conta requisitos que permitam a aplicação efetiva do sistema, nomeadamente as estruturas, equipamentos, higienização, controlo de pragas, abastecimento de água, recolha de resíduos, materiais em contacto com alimentos, higiene pessoal e formação. Estes requisitos tendem a conferir e controlar os perigos associados ao meio envolvente ao processo de produção. Para verificar e determinar a conformidade das normas, a competência de execução dos sistemas e a aplicação e cumprimentos dos requisitos, as empresas são submetidas inúmeras vezes a auditorias. (9,12,13)

As auditorias aos sistemas de segurança alimentar e HACCP servem para verificar se os requisitos e os planos HACCP estão efetivamente implementados e são adequados, podendo ser consideradas como processos de comparação da realidade com o estabelecido, constituindo um importante meio à gestão empresarial e laboratorial. (6)

2. Silliker Portugal, S.A.

A Silliker Portugal, S.A. é uma empresa multinacional norte-americana, presente em cerca de 21 países. Definida como instituição independente de prestação de serviços, intimamente relacionada com diversos ramos do sector agroalimentar, apresenta resposta às necessidades do mercado no que concerne à qualidade e segurança alimentar. Desde meados de 2014 que adota internacionalmente a designação de Mérieux NutriSciences e dedica-se a proteger a saúde dos consumidores, apresentando um vasto leque de serviços analíticos e de consultadoria para as indústrias do sector alimentar e da nutrição. Paralelamente, abrange diferentes vertentes, nomeadamente nas áreas da água e ambiente, bens de consumo, farmacêutica, cosméticos e agroquímicos. Em Portugal, o laboratório situa-se em Vila Nova de Gaia e conta com cerca de uma centena de colaboradores subdivididos nos diversos departamentos e com funções distintas. (3)

O Departamento de Microbiologia, onde se desenvolveu o presente trabalho, é responsável pelo controlo microbiológico de uma variada gama de produtos alimentares oriundos de distintas fontes. Uma vez que os padrões de qualidade e segurança alimentar exigem a determinação da presença de diversos microrganismos, como por exemplo *Salmonella spp* e *Escherichia coli*, suscetíveis de causar danos severos à saúde do consumidor, o trabalho desenvolvido diariamente pelos técnicos deste departamento surge como imprescindível para a concretização da garantia de qualidade de um dado género alimentício. O trabalho efetuado no laboratório de microbiologia está definido de modo a permitir que as amostras avancem num trajeto de sentido único, não existindo cruzamento entre materiais e produtos. Desta forma garante práticas exímias na manipulação dessas mesmas amostras, respeitado as boas práticas de laboratório definidas pelo departamento. (3)

Numa altura em que a promoção da qualidade e segurança alimentar se acentua, e que a oferta de serviços de análises e assessoria escasseia, a empresa assume uma posição de liderança no sector

de atividade e estabelece como pilares fundamentais a reação, compromisso, confiança, proatividade, coerência, solução, liderança e qualidade. (3)

3. Objetivos

A formulação dos objetivos incidiu sobre critérios passíveis de serem atingíveis e com pertinência acrescida para a temática desenvolvida. Nesse sentido foram definidos cinco objetivos essenciais, apresentados nos pontos abaixo, que visam, particularmente as estratégias de desenvolvimento do presente trabalho. Assim, os objetivos formulados são:

- Adquirir competências em validação de métodos;
- Adquirir competências na realização de auditorias técnicas;
- Averiguar se os pressupostos das normas estão a ser cumpridos no laboratório;
- Compreender os conceitos inerentes à viticultura.
- Executar auditoria técnica ao método ISO 10718:2015;
- Validar o método normativo ISO 21527-2:2008.

4. Sistema de Gestão da Qualidade

O termo qualidade não é unânime globalmente, pois a percepção individual e social pode influenciar a experiência de cada um. Em termos industriais denota uma conotação de mais e melhor, atendendo a determinadas condições e/ou parâmetros inerentes ao consumidor, sendo este que, em última instância, determina a classe e a qualidade do produto/serviço. (14,15)

O conceito "Qualidade" de um produto encontra-se inequivocamente associado ao sentido de bem-estar, satisfação do cliente e fiabilidade do mesmo, sendo que, nesse sentido, pode ser definida como o grau de satisfação dos requisitos referentes a um conjunto de características intrínsecas, ou seja, exibe o resultado da combinação de características do projeto e da produção, determinantes na satisfação que o produto possa proporcionar ao consumidor, durante o seu uso. Tal definição remete-nos a cogitar em termos como, fiabilidade, adequabilidade e durabilidade, que na realidade não são mais do que características individuais que em conjunto constituem a qualidade do produto. Em termos gerais, tem vindo a tornar-se num fator intrínseco à competitividade global, sendo que à medida que a concorrência aumenta, dada a globalização dos mercados, a evolução técnica, tecnológica e a exigência do cliente aumentam exponencialmente de forma proporcional. Assim, qualquer que seja a definição de Qualidade, esta deve potenciar resposta às necessidades do cliente, de forma clara e distinta, tendo por base o tipo de produto que se está a produzir e/ou o serviço que se está a prestar. (14,15,16,17)

A gestão da qualidade cada vez mais se afirma como componente central das estratégias de desenvolvimento organizacional, assim como um método de defesa perante a incerteza e a

complexidade da envolvente competitiva, que toda e qualquer empresa enfrenta no seu quotidiano. Na atualidade, a exigência do cliente é mais notória no que concerne à qualidade dos produtos ou serviços exigidos, ostentando uma necessidade de melhoria constante. Atendendo a esta premissa, para que ocorra uma gestão de qualidade eficaz, esta deve ser orientada no sentido de criar pilares fundamentais, isto é, deve ostentar uma matriz essencial, bem definida, em matéria de conceção, fabrico e/ou prestação de serviço e utilização. (15,16,18)

No que respeita à qualidade em termos de conceção devem ser abrangidos os dados que remetam tanto para as necessidades como para as expectativas do consumidor, em que o projeto as incorpore, quer em termos funcionais, quer em termos técnicos. Por sua vez, a qualidade do fabrico, ou da prestação de um dado serviço, garante as características do produto, tendo em conta o que o consumidor espere desse mesmo produto/serviço. Como o próprio nome indica, a qualidade de utilização determina as competências em termos de desempenho/performance. Em situações mais específicas, pode ainda ser definido um parâmetro extra que remete para a qualidade relacional, que implica a eficácia dos contactos com os clientes, incluindo os clientes internos. De salientar que a qualidade pode ser afetada por todas as pessoas que estabelecem esse mesmo contacto. A pertinência de obter o maior grau de satisfação é essencial à sobrevivência de qualquer empresa e do próprio produto pelo que a criação, manutenção e aperfeiçoamento de um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) torna-se imprescindível, uma vez que este surge como uma estrutura organizacional criada para gerir e garantir a Qualidade, os recursos necessários, os procedimentos operacionais e as responsabilidades estabelecidas. (14,16,17,19)

Um Sistema de Gestão da Qualidade denota um conjunto de medidas organizacionais aptas a transmitir a confiança de que um determinado nível de qualidade está a ser alcançado, de preferência com o mínimo custo. Este sistema é capaz de alcançar e otimizar objetivos, assegurando de forma sistemática a atribuição de recursos e responsabilidades, para que a organização, no que respeita à qualidade, cresça viável, efetiva e competitiva. A implementação de um SGQ permite que cada membro de uma empresa saiba o que fazer e o que se espera do seu trabalho, como fazer o seu trabalho, como e quando realizar as suas tarefas, permitindo que cumpra com as especificações técnicas essenciais e obrigatórias. (16,18)

O sistema de gestão (SG) implementado denota como objetivo assegurar a qualidade, e integridade, de todos os dados obtidos através de uma doutrina de organização, e de gestão, baseada em procedimentos, segundo os quais todas as actividades se planificam, concretizam, controlam, registam e conseqüentemente são apresentadas. Em termos gerais, procura auxiliar as organizações a ampliar continuamente a satisfação dos seus clientes, atendendo às necessidades e expectativas. Estas expectativas são ininterruptamente refletidas em requisitos tanto materiais, como em serviços e informações e são comuns globalmente, independentemente da empresa. Em suma remete-nos

para um conceito de uma rede internacional de informações sobre normas, padrões e qualificações para o alcance da qualidade por excelência. (16,20,21)

Para assegurar que todos os elementos de uma dada empresa atuam de forma equiparável, foi concebido um documento como base de referência de todo o SGQ, o Manual da Qualidade. (14)

O Manual da Qualidade da Silliker Portugal, S.A. determina, de forma descritiva, a metodologia de funcionamento de um dado laboratório, não só pela simples execução dos métodos analíticos, mas também pela identificação de todas as possíveis causas de variação relacionadas com as amostras, com os métodos e com a informação, mitigando assim o seu efeito sobre a fiabilidade dos resultados analíticos, o que promove, por sua vez, uma melhoria contínua. (14)

Nesse sentido, com o mesmo, pretende-se:

- Comunicar as políticas, os procedimentos e os requisitos da qualidade (assegurando a qualidade do serviço prestado ao cliente);
- Descrever e implementar um sistema de gestão eficaz;
- Apresentar interna e externamente o SG como forma de demonstração do cumprimento dos requisitos da norma ISO/IEC 17025:2017;
- Proporcionar a base documental para auditar o SG;
- Formar os colaboradores nos requisitos do SG (incutindo o espírito da qualidade e a importância que cada um assume nas tarefas que desempenha, exponenciando a relevância que estas denotam no resultado final, tendo como objetivo a melhoria contínua);
- Proporcionar a continuidade do SG e respetivos requisitos em situação de mudança. (14)

Todas as atividades desenvolvidas num laboratório são avaliadas regularmente através do recurso a auditorias: técnicas (focadas nos métodos), auditorias internas (química, microbiologia e SG), auditorias de 3.ª parte (acreditação e outros reconhecimentos) e, caso solicitado, auditorias de clientes. (14)

A consciencialização das organizações de que a implementação de um Sistema de Gestão da Qualidade traz benefícios à organização e que a satisfação dos clientes está sempre em primeiro lugar, são determinantes para o sucesso da organização. Nesse contexto, um SGQ documentado é um pré-requisito para a obtenção da acreditação. (19)

5. Acreditação

Em prática laboratorial, procedimentos analíticos bem-sucedidos resultam, geralmente, de habilidades bem desenvolvidas, e praticadas, no que concerne ao manuseamento de materiais, no cuidado e atenção na preparação de amostras e reagentes, seguindo rigorosamente as instruções do processamento ao longo das suas etapas, e na antecipação a potenciais fatores influenciadores envolvidos no método. A indústria alimentar depara-se quotidianamente com inúmeros desafios

impostos pela sociedade global, desde o produtor até ao consumidor final. A procura por produtos seguros e de qualidade é um objetivo atingível que carece de um esforço coletivo de todos os setores e, conseqüentemente, de todos os recursos, humanos e materiais, envolvidos. Laboratórios que promovam estas diretrizes são encarados como os mais fidedignos. De salientar que, hoje em dia, as empresas são mais exigentes e, um fator selecionador dos serviços prestados por um laboratório compreende o facto de este promover métodos de ensaio acreditados. Assim as análises laboratoriais efetuadas por um laboratório com metodologias acreditadas, segundo a norma ISO/IEC 17025:2017, demonstram maior confiança e credibilidade. Torna-se imprescindível, numa indústria cada vez mais competitiva, demonstrar a competência técnica do laboratório. (22,23,24,25)

O processo de acreditação encontra-se sujeito a legislação que obriga a um funcionamento dos laboratórios de forma dinâmica, sendo esse mesmo funcionamento apurado através de um sistema de avaliação de conformidade rigoroso, baseado nas normas redigidas, e emitidas, pelos organismos internacionais de acreditação, nomeadamente a *European Cooperation for Accreditation (EA)*³, a ILAC (*International Laboratory Accreditation Cooperation*) e a IAF (*International Accreditation Forum*). Os critérios de acreditação dependem essencialmente da tipologia do laboratório, porém, para laboratórios de ensaio e calibração devem ser cumpridos os requisitos expressos no referencial normativo ISO/IEC 17025:2017, seguido a nível mundial, permitindo que distintos países estabeleçam protocolos, ou acordos, baseados na avaliação e aceitação mútua dos sistemas de acreditação de cada um deles. Para além de servir de pilar ao Sistema de Qualidade do laboratório surge como referência para atestar a competência do mesmo denotando princípios técnicos e de gestão a serem adotados para garantir a qualidade dos serviços prestados e demonstrar a sua competência técnica. (25,26,28)

No nosso país, como membro integrante da EA, o único organismo responsável pela acreditação nacional é o Instituto Português de Acreditação (IPAC), em consonância com as disposições referidas pelo Regulamento (CE) nº 765/2008, sendo uma entidade que denota independência e imparcialidade e exerce atividade como autoridade pública, sob a supervisão do Estado Português, impondo-se como agente regulador dos organismos de avaliação da conformidade. Nesse sentido, visa prestar um serviço em prol da segurança e qualidade, ao selecionar, treinar e qualificar um conjunto de avaliadores e peritos, que se encontram sujeitos ao dever do sigilo profissional e imparcialidade. (18,19)

A Silliker Portugal S.A., no seu Manual da Qualidade (2021) define acreditação como o *“Reconhecimento, por parte de uma entidade independente, relacionado com a avaliação da conformidade e a demonstração da competência na realização dessas atividades.”*, seguindo os

³ Detém, entre outras, a responsabilidade de executar um sistema de avaliação do IPAC e divulgação dos resultados decorrentes dessa avaliação.

pressupostos do IPAC que refere que corresponde a um “...procedimento através do qual o organismo nacional de acreditação reconhece que uma entidade é competente para efetuar determinadas atividades de avaliação da conformidade (e.g.: ensaios, calibração, certificação, inspeção)”. Segundo a mesma entidade a acreditação é voluntária, porém “... num número crescente de áreas, o respetivo enquadramento legislativo identifica a acreditação como condição necessária para o exercício da atividade.” (14,24, 25,27)

O processo de acreditação é moroso e acarreta encargos elevados a nível económico, de rentabilidade de tempo e na necessidade de profissionais qualificados, face à exigência de cumprimento rigoroso no âmbito da acreditação. Estes fatores dependem, sempre, da estrutura e funcionamento de cada laboratório. A demora do processo na atribuição da acreditação é justificada pelas distintas etapas que engloba (Tabela II) detalhadas no Regulamento Geral de Acreditação (DRC001), podendo ser resumidas em três importantes momentos:

- a solicitação, que compreende a apresentação de uma candidatura que se inicia com o envio dos formulários correspondentes à atividade técnica que pretende desempenhar;
- a avaliação, que consiste na análise dos documentos e na avaliação presencial;
- a decisão que, sendo favorável, remete para a emissão de um certificado de acreditação. (28, 29)

Sempre que um laboratório, ou entidade, possua um certificado é obrigado a cumprir todos os princípios estabelecidos e encontra-se autorizado a utilizar o selo de acreditação nos boletins de análise e certificados de calibração. (28,29)

Tabela II – Processo de Atribuição de Acreditação

| Processo de Atribuição de Acreditação | |
|--|---|
| Fase | Descrição |
| Solicitação/ Candidatura | 1 – Abertura de um processo de candidatura junto ao IPAC, onde será atribuído um código de registo à entidade e um gestor de processo; 2 – Envio dos documentos/formulários ao IPAC. |
| Avaliação | 1 – Nomeação de uma Equipa Avaliadora por parte do IPAC; 2 – Avaliação documental, visita prévia e/ou auditoria presencial (data comunicada aos membros da entidade) onde surge o primeiro relatório com deteção de não conformidade, opiniões e oportunidades de melhoria; 3 – Período de planificação das ações corretivas em resposta às eventuais observações registadas de forma a demonstrar o cumprimento das normas de acreditação. |
| Decisão | 1 – Equipa avaliadora examina o plano de ações corretivas e emite um parecer; 2 – Análises processual pelo IPAC; 3 – Emissão do certificado de acreditação, se decisão favorável, uma vez regularizadas as custas do processo; 4 – Autorização para utilização da marca da acreditação. |

Obter acreditação, mesmo sendo um processo complexo, denota benefícios para as entidades em termos organizacionais, técnicos, éticos e em termos de posição no mercado. As principais vantagens relacionam-se com a imagem de qualidade que o laboratório transmite, fruto da implementação de procedimentos de controlo mais rigorosos, a obrigatoriedade de rastreabilidade registada, o reconhecimento de se tornar uma entidade independente (com a possibilidade de cooperar com outras entidades acreditadas) e a oferta de uma resposta mais rápida e eficaz. Em suma a acreditação surge como uma preponderante estratégia de marketing, uma vez que proporciona o reconhecimento da qualidade e da competência do laboratório e a oferta de um serviço reconhecido à escala global, satisfazendo as necessidades do cliente, garantindo respeito, profissionalismo, imparcialidade e confidencialidade, face aos resultados obtidos, assim como de uma assistência permanente. Tais factos contribuem eficazmente para a sustentabilidade de qualquer laboratório/empresa. Manter o certificado exige a contratação de manutenção de recursos humanos competentes, instalações apropriadas, recursos materiais adequados, métodos de ensaio e/ou calibração validados e uma revisão contante dos procedimentos, sendo este um meio de consciencialização sobre a necessidade de melhorias contínuas. (23,27,30)

Contudo, como em qualquer processo com este grau de complexidade, existem dificuldades que todas as entidades enfrentam, relacionadas com as exigências de implementação dos requisitos da ISO/IEC 17025:2017. Os custos elevados são as que mais se evidenciam e encontram-se intimamente conectados à necessidade de recrutamento de recursos qualificados, à otimização de infraestruturas, à aquisição de equipamentos adequados, e conseqüente manutenção, e aos processos de auditoria. Paralelamente, o excesso de documentação produzido pode complexificar o funcionamento do laboratório e, aquando da implementação da norma surge uma sobrecarga de trabalho conseqüente, relacionada com a averiguação do cumprimento dos requisitos normativos ou com a retificação de possíveis falhas detetadas. (19,23)

A acreditação pelas entidades competentes surge como o sinal mais evidente da competência do laboratório. Porém o facto de este ter cumprido todos os trâmites e, conseqüentemente, ter sido reconhecido como acreditado, não significa que este estado se mantenha de forma permanente, até porque tem de existir um esforço para cumprir continuamente os critérios de acreditação, isto é, como referido anteriormente, os requisitos que os laboratórios devem e têm de cumprir. Estes podem ser classificados como gerais (aplicáveis a todas as acreditações) e específicos (depende do tipo de acreditação). Os primeiros encontram-se definidos no DR001 e os específicos dependem do tipo de laboratório. (27,28,29,30)

No caso concreto da Silliker Portugal S.A., a mesma possui uma acreditação flexível global o que lhe concede autorização para *"...incluir atividades adicionais (produto e/ou parâmetro e/ou documento normativo) no seu âmbito de acreditação com base nas suas próprias validações, sem a*

avaliação do Organismo Nacional de Acreditação antes da operação (produção de resultados) da atividade.” Tal facto permite, simultaneamente, introduzir métodos novos (modificados ou desenvolvidos pelo laboratório), contudo não inclui a introdução de novos princípios de análise. Esta acreditação tanto pode ser do tipo A (implementação de métodos normalizados) como do tipo B (implementação de métodos desenvolvidos internamente ou adaptados pelo laboratório). Paralelamente a empresa denota, também, uma acreditação flexível intermédia que lhe proporciona a capacidade para “...implementar novas versões de documentos normativos no âmbito da acreditação, pressupondo-se que a nova versão apresente características similares à anterior...”. (14)

Um laboratório acreditado é comprovado pela atribuição de um certificado onde se encontra expresso, ao pormenor, o âmbito da acreditação que, dada a avaliação, pode não abranger todas as atividades que a empresa exerce, sendo essa uma decisão do IPAC. Este documento revela um número de registo inequívoco⁴ e, como anteriormente referido, o processo de atribuição encontra-se acessível a toda e qualquer identidade, de forma imparcial e não discriminatória, independentemente da sua natureza (pública ou privada), dimensão ou atividade, desde que os critérios de acreditação sejam cumpridos. O certificado tem uma validade de três anos, ainda que de forma a avaliar se os laboratórios continuam a cumprir os requisitos, devam ser executadas reavaliações periódicas, sendo que a primeira deve ocorrer até doze meses a contar da data de atribuição da certificação. De salientar que o processo é contínuo e inclui ações de acompanhamento e monitorização. Importa referir que uma entidade acreditada pode perder a acreditação sempre que deixar de estar ativa ou então pode, em qualquer momento, requerer a extensão, redução, suspensão ou anulação da sua acreditação. Para que o estado se mantenha ativo são realizadas auditorias que atestam a validade do certificado. (24,28,29)

A acreditação concedida às entidades é o resultado de múltiplos esforços que abrangem uma melhor qualidade na prestação de determinados serviços. Um laboratório acreditado transmite confiança acrescida e um compromisso eficaz para com o cliente. (19,23)

6. Validação

Qualquer laboratório acreditado deve cumprir, de forma eficaz, a globalidade dos preceitos expressos na norma ISO/IEC 17025:2017, assim como os pressupostos definidos pelo IPAC através do guia para a aplicação dessa mesma norma (OGC 001). Na prática, qualquer laboratório submete-se à obrigatoriedade de evidenciar a validação dos métodos de ensaio, garantindo, simultaneamente, a qualidade dos resultados obtidos e um desempenho satisfatório. Nesse sentido, é cada vez mais perentória a necessidade de comprovar essa mesma qualidade, cientes de que por vezes, possam ser revelados possíveis erros (sistemáticos e/ou aleatórios) que potenciam, conseqüentemente, uma

⁴ O número de acreditação da *Silliker*S.A. é L0087.

deturpação significativa dos resultados finais. Sendo a validação um requisito subentendido à norma, a mesma refere que um laboratório *“deve validar métodos não-normalizados, métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório e métodos normalizados que sejam utilizados fora do âmbito previsto ou modificados de alguma forma. ...”* (8,30,31)

Por validação subentende-se a *“comprovação, através de evidências objetivas, de que o método cumpriu os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido”*, o que, em termos gerais, resulta na concretização de procedimentos de validação de métodos normalizados e não normalizados. Os primeiros abrangem as metodologias que se regem precisamente pela norma ou documento normativo (NP, ISO, NF), enquanto que, os segundos, representam os métodos que não estão incluídos na definição de um método normalizado, ou seja, *“métodos provenientes de adaptações de métodos normalizados ou métodos integralmente desenvolvidos pelo laboratório”*. (30,31,32)

Laboratórios que adotem, no seu quotidiano, métodos normalizados precisam, simultaneamente à validação, de certificar que demonstram competências técnicas para os executar, ou seja, para assegurar que o laboratório revela capacidade para efetuar as atividades declaradas. Para o efeito, garantindo essa especificidade, efetiva-se uma validação secundária ou verificação, que avalia o trabalho desenvolvido pelo laboratório e, conseqüentemente, comprova o cumprimento das especificações e da adequação ao método normalizado. (30,31,33,34)

A verificação traduz-se na capacidade de um determinado laboratório replicar um método normalizado, com um nível de desempenho aceitável, sendo que deve ser concretizada quando o laboratório pretende implementar esse mesmo método. Para o efeito, a verificação almeja assegurar que o laboratório é competente em conceber dados de desempenho similares àqueles estabelecidos na validação primária. (32)

Os laboratórios devem elaborar um protocolo de validação do método, que varia conforme a natureza qualitativa ou quantitativa do mesmo, com o intuito de apurar se os métodos aplicados são apropriados à sua execução. (Tabela III). Por sua vez, a validação de uma determinada metodologia deve refletir o contexto real de trabalho quotidiano, o qual pode ser expresso pela utilização de matrizes alimentares contaminadas, de forma natural e/ou artificial, devendo o primeiro caso ser privilegiado sempre que possível, porém a vertente artificial é, não raramente, a única solução disponível. De salientar que a adição de microrganismos contaminantes, a uma matriz, não se comporta de forma equivalente à presença de contaminantes inatos, uma vez que apenas simula, de forma discreta, esta presença. (27,30,32,34)

Os métodos sujeitos a validação são, genericamente, subdivididos em qualitativos, cuja resposta exhibe a presença, ou ausência, do microrganismo alvo numa determinada porção de amostra, ou

quantitativos, cuja resposta relaciona-se com a quantidade do microrganismo alvo evidenciada numa determinada amostra. (32,34)

Tabela III – Protocolo de Validação da Silliker S.A. para alimentos

| Protocolo de Validação de Métodos de Alimentos | |
|---|---|
| Identificação das matrizes analisadas em rotina. | |
| Experiência do método. | |
| Princípio do método. | |
| Métodos Qualitativos | Métodos Quantitativos |
| Realização no mínimo de 30 ensaios, dos quais no mínimo 10 positivos, e no mínimo 2 brancos e abrangendo as diferentes matrizes, para o cálculo da sensibilidade, especificidade, eficiência, seletividade, taxa de falsos positivos e taxa de falsos negativos. | <ul style="list-style-type: none"> - Realização no mínimo de 30 ensaios, dos quais 10 amostras naturais contaminadas, e no mínimo 2 brancos e abrangendo as diferentes matrizes, para o cálculo das características do desempenho: cálculo da sensibilidade, especificidade, eficiência, seletividade, taxa de falsos positivos e taxa de falsos negativos. - Carta de controlo do DPCS ou carta de amplitude de duplicados (impresso IQ.178). - Realização de 10 ensaios positivos em paralelo, para os grupos de matrizes aplicáveis, para o cálculo da incerteza. |
| Uma participação satisfatória num ensaio de comparação interlaboratorial (impressos IQ.250A – Avaliação dos circuitos interlaboratoriais – Microbiologia Quantitativa, e IQ.250B Avaliação dos circuitos interlaboratoriais – Microbiologia Qualitativa), se aplicável. | |

Em microbiologia, tendo por base as metodologias utilizadas, os métodos são validados perante a avaliação de parâmetros específicos, nomeadamente: exatidão, incerteza, precisão, sensibilidade, especificidade, taxa de falsos positivos, taxa de falsos negativos, seletividade, eficiência e coerência. (27,32,34)

6.1. Precisão

A precisão é definida como a “concordância entre os resultados obtidos por aplicação do mesmo procedimento de ensaio várias vezes em materiais idênticos, em condições definidas”, sendo considerada uma medida do grau de repetibilidade ou reprodutibilidade de um dado método (Quadro I). (32,33,35).

Repetibilidade expressa a precisão de um método de ensaio efetuado em condições experimentais similares, num curto intervalo de tempo. As variáveis inerentes devem ser tão idênticas quanto possível no que concerne ao analista, ao laboratório, ao equipamento e aos reagentes utilizados, isto é, devem ser os mesmos.

Reprodutibilidade manifesta a precisão de um método de ensaio executado em condições experimentais díspares, utilizando o mesmo método, numa mesma amostra, variando as condições de medição, ou seja, técnicos, laboratórios, técnicas de

Quadro I – Definição de repetibilidade e reprodutibilidade

Na prática, a realidade dos laboratórios não é demonstrada eficazmente através destes termos, uma vez que a situação de variabilidade dos resultados laboratoriais, a longo prazo, não se encontra contemplada. Desta forma, tornou-se preponderante, a conceção de um termo mais inclusivo, conhecido como precisão intermédia, ou reprodutibilidade intralaboratorial, sendo esta definida como *“concordância dos resultados obtidos no próprio laboratório, em ensaios espaçados no tempo e independentes, aplicando o mesmo método de análise à mesma amostra e nas condições normais de funcionamento do laboratório com respeito aos operadores e equipamento utilizado”*, ou seja, variam os analistas, os equipamentos, os lotes de material, os reagentes utilizados, os meios de incubação e o período temporal. Desta forma, a sua quantificação consiste em executar distintas medições sobre uma amostra, ou padrão, variando os parâmetros experimentais em cada uma delas. Em termos gerais aceita-se como sendo mais representativa da variabilidade de resultados num laboratório, e como tal, mais aconselhável de usar. (32,34,35)

A precisão é obtida através do desvio padrão de reprodutibilidade (S_R), infracitado, sendo habitualmente expressa como desvio padrão relativo ou coeficiente de variação⁵. (32, 34)

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$$

i = matriz alimentar

y_{iA} = log(resultado da primeira réplica)

y_{iB} = log(resultado da segunda réplica)

n = número total de amostras

6.2. Estimativa da incerteza

A avaliação da incerteza (Quadro II), através de uma abordagem global, também reconhecida como *“top down”* ou *“black box”*, de um determinado método, representa o meio essencial para determinar a fiabilidade do mesmo, baseando-se no estudo estatístico de uma série de observações repetidas do resultado final. (36,37)

Incerteza: *“Termo utilizado para definir a dispersão dos valores /resultados atribuídos a uma análise laboratorial, indicando o nível de confiança estimado”, sendo um “... parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão de valores que se pode razoavelmente atribuir à grandeza medida.”*

Quadro II - Definição de incerteza

⁵ O desvio padrão relativo é calculado dividindo o desvio padrão de reprodutibilidade pela média e multiplicando por 100, sendo expresso em percentagem.

A incerteza de um determinado ensaio encontra-se inteiramente conectada a variáveis que, usualmente, não se repetem, tais como: (32,37)

- Incerteza da leitura: dada a inter-relação do olho e da mente humana. Por exemplo de leituras repetidas, pelo mesmo analista, podem advir resultados díspares.
- Preparação da amostra: relacionada com homogeneização incorreta da amostra preparada;
- Pesagem: inclui a incerteza da calibração das balanças.
- Variação nos meios de cultura, tais como o pH;
- Determinações volumétricas, exemplo da pipetagem;
- Recuperação de microrganismos stressados
- Competitividade de microrganismos (presentes na amostra)
- Desempenho dos recursos humanos/ Técnicos laboratoriais;
- Variabilidade das matrizes;
- Equipamentos.

Tais variáveis, conjuntamente, determinam a incerteza que, como mencionado anteriormente, é estimada através de uma abordagem global, baseada em resultados experimentais com replicação da mesma análise, sendo calculado o desvio padrão de reprodutibilidade intralaboratorial. A combinação das mesmas pode ser retratada através de um diagrama simplificado (Imagem 1), sendo a mesma a representação gráfica do processo analítico. (37)

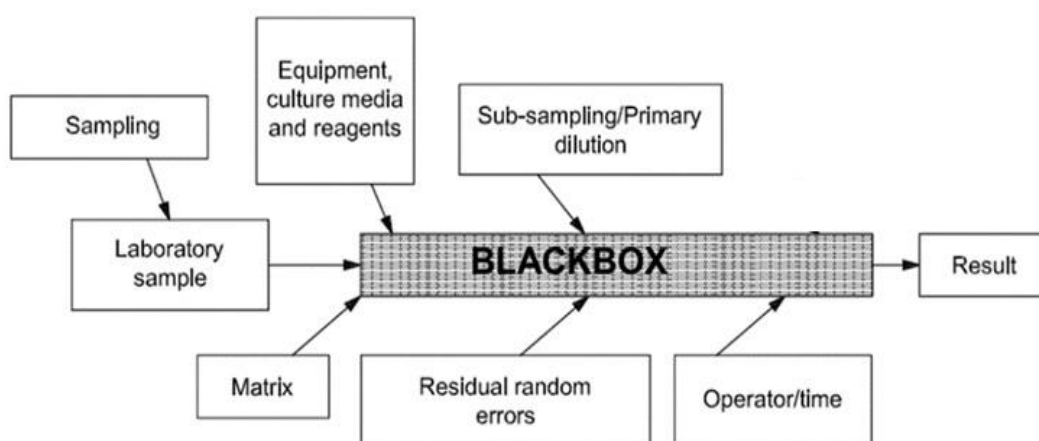


Imagem 1 - Abordagem global da incerteza (Fonte: Silliker, 2009)

De forma a determinar a incerteza (U), é necessário ter em consideração um fator k , que neste caso, apresenta o valor de 2, que corresponde aproximadamente a um nível de confiança de 95 %. Deste modo, a incerteza é expressa pela seguinte fórmula: $U = 2 \times S_R$. (32,36,37)

A incerteza pode ser, indubitavelmente, tida como uma medida da qualidade do resultado, quando corretamente estimada, isto é, quanto menor a incerteza, maior a qualidade. Assim sendo, o valor

verdadeiro, deverá estar alocado, como demonstra a Imagem 2, ao intervalo de incerteza definido para o resultado obtido. (35)

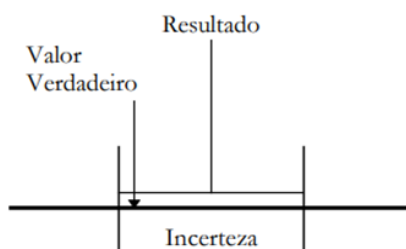


Imagem 2 - Intervalo de estimativa da incerteza (Fonte: RELACRE, 2007)

De salientar que a estimativa da incerteza possibilita unicamente avaliar a confiança dos resultados e, deste modo, não deve ser comparada com a competência do laboratório. Destaca-se ainda o facto da incerteza não poder ser aplicada a outros métodos, na medida em que é estimada para apenas um. (36,38)

6.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico permite avaliar a proximidade entre o valor obtido pelo método de análise e o valor de referência, convencionalmente aceite como verdadeiro. Tal parâmetro pode ser estimado com a participação em ensaios interlaboratoriais. (32,35)

O fator de desempenho “z-score”, que atendendo à sua definição “indica quantos desvios-padrão um resultado se encontra da média”, sempre que empregue, possibilita a quantificação da avaliação do desempenho alcançada pelo laboratório, sendo este calculado pela expressão matemática: (32,35)

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s}$$

Esta fórmula conjuga o resultado obtido pelo método de análise em estudo (X_{lab}), o resultado aceite como verdadeiro (X_v) e o desvio-padrão (S) resultante do conjunto de dados obtidos por todos os laboratórios presentes no ensaio interlaboratorial. (32,35)

Uma vez calculado, o fator de desempenho é avaliado segundo uma escala de pontuação (Imagem 3) que determina se um dado resultado é considerado satisfatório/aceitável, questionável ou incorreto. Assim sendo, podemos constatar que quanto menor o resultado do “z-score” melhor rendimento obteve um dado laboratório. (32,35)

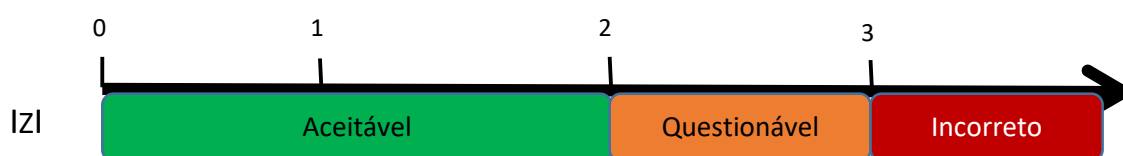


Imagem 3 - Esquema representativo da avaliação da exatidão por “z-score”

6.4. Carta de amplitudes ou duplicados

A carta de amplitudes é uma ferramenta essencial através da qual se obtêm os critérios de precisão, representado, igualmente, ao longo do tempo, a disparidade de valores entre distintos ensaios repetidos (≥ 2) do mesmo material, ou de materiais diferentes, no que respeita a uma determinada gama de trabalho. Assim sendo, as cartas denotam particular pertinência na verificação de desempenho de um dado processo, isto é, se o mesmo se encontra em situação de controlo, permitindo, conseqüentemente, identificar possíveis não conformidades. Tal facto torna-as, internacionalmente, aceites como um dos meios mais eficazes de proceder a um controlo contínuo no que concerne aos resultados obtidos. Em termos práticos permite, concomitantemente, a análise do controlo da qualidade dos produtos através de uma representação gráfica como a expressa na Imagem 4. (32,35,39)

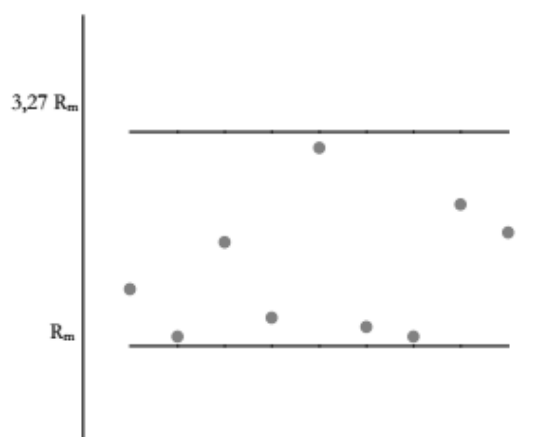


Imagem 4 - Carta de Amplitudes ou de Duplicados (Fonte: RELACRE, 2007)

A carta de duplicados, utilizada como meio de controlo de qualidade, representa, de forma individualizada, tanto na sua elaboração como apresentação, as características inerentes de cada método e, permite, simultaneamente, o cálculo do critério de precisão. Para o efeito devem ser reunidos um mínimo de 15 resultados iniciais, oriundos de uma amostra submetida a critérios de precisão intermédia, ou seja, em dias diferentes, executado por todos os analistas e equipamentos. (32,35,39)

No que concerne ao critério de precisão, o mesmo é calculado através da fórmula $\hat{R} \times 3,27$, sendo que dever-se-á transmutar cada par de duplicados (executados por distintos analistas) em \log_{10} . Em seguida procede-se à determinação do valor da amplitude (R_{\log}) dos logaritmos $|\log D1 - \log D2|$ ⁶, consecutivamente, da média dessas mesmas amplitudes em que $\hat{R} = \sum (R_{\log}/n)$. O valor de critério de precisão é comumente utilizado como metodologia de verificação da variabilidade dos duplicados concretizados durante o ano, por rotina, pelos diferentes analistas, devendo ser reavaliado esporadicamente. Serve igualmente para avaliar o desempenho dos técnicos. (39)

⁶ D1 – duplicado um; D2 – duplicado dois.

6.5. Parâmetros de desempenho do método

Os parâmetros de desempenho para um método encontram-se descritos na Tabela IV, bem como, as suas fórmulas matemáticas. (30,32)

Tabela IV - Parâmetros de desempenho de um método

| Parâmetros de desempenho do método |
|--|
| <p>Eficiência: Fração de colónias/ensaiois totais corretamente atribuídas na contagem presuntiva.</p> $Eficiência = \frac{(n^{\circ} \text{ ensaios presuntivos verdadeiros} + n^{\circ} \text{ ensaios não presuntivos verdadeiros})}{n^{\circ} \text{ total de ensaios}}$ |
| <p>Especificidade: Fração total de negativos, corretamente atribuídos na contagem presuntiva. Normalmente a especificidade é >80%</p> $Especificidade = \frac{n^{\circ} \text{ ensaios não presuntivos verdadeiros}}{n^{\circ} \text{ ensaios não presuntivos verdadeiros} + n^{\circ} \text{ ensaios presuntivos falsos}}$ |
| <p>Seletividade: Rácio do número de ensaios alvo com o número total de colónias. Normalmente os resultados não são válidos se seletividade for <10%.</p> $Seletividade = \frac{n^{\circ} \text{ ensaios presuntivos verdadeiros}}{n^{\circ} \text{ total de ensaios}}$ |
| <p>Sensibilidade: Capacidade do método em detetar o organismo-alvo. Fração do total de positivos, corretamente atribuídos na contagem presuntiva. Normalmente a sensibilidade é >90%.</p> $Sensibilidade = \frac{n^{\circ} \text{ ensaios presuntivos verdadeiros}}{n^{\circ} \text{ ensaios presuntivos verdadeiros} + n^{\circ} \text{ ensaios não presuntivos falsos}}$ |
| <p>Taxa de falsos positivos (TFP): Fração de positivos (por exemplo: colónias típicas) que demonstram ser devido a organismos não-alvo</p> $TFP = \frac{n^{\circ} \text{ ensaios presuntivos falsos}}{(n^{\circ} \text{ ensaios presuntivos verdadeiros} + n^{\circ} \text{ ensaios presuntivos falsos})}$ |
| <p>Taxa de falsos negativos (TFN): Fração de negativos (por exemplo: colónias atípicas) que demonstram ser colónias alvo.</p> $TFN = \frac{n^{\circ} \text{ ensaios não presuntivos falsos}}{n^{\circ} \text{ ensaios não presuntivos falsos} + n^{\circ} \text{ ensaios presuntivos falsos}}$ |

7. Auditoria

As auditorias resultam da necessidade dos laboratórios cumprirem os pressupostos essenciais à manutenção da acreditação e consistem, principalmente, numa avaliação presencial com o intuito de proceder a um diagnóstico detalhado, e sistemático, das atividades desenvolvidas no âmbito desse mesmo processo de acreditação. Segundo a Silliker Portugal S.A. (2021) podemos distinguir diferentes tipologias de auditorias que se realizam no local onde a empresa desenvolve as atividades, avaliando, desta forma, o cumprimento dos critérios relacionados com a conformidade dos requisitos acreditados e a eficácia dos sistemas de gestão empresarial. Nesse sentido a empresa define a auditoria da qualidade como um *"processo sistemático, independente e documentado para obter registos, afirmações factuais ou outra informação e respetiva avaliação objetiva com vista a determinar em que medida os requisitos normativos são satisfeitos."* Cada empresa é responsável pelo desenrolar, em termos de planeamento e implementação, das suas auditorias, sendo que as mesmas podem ser divididas em auditoria de primeira parte, ou interna, que consiste na avaliação *"...executada por uma organização aos seus próprios sistemas, procedimentos e instalações, recorrendo a pessoal próprio qualificado ou a auditores contratados."* Em estreita associação a esta surge a auditoria técnica, que é realizada *"...preferencialmente por um analista (técnico de laboratório) aos ensaios. Com esta metodologia pretende-se garantir que todos os métodos do âmbito da acreditação são auditados no mínimo a cada dois anos...e os restantes métodos auditados em períodos não superiores a 4 anos."* Paralelamente são igualmente definidas pelo menos mais duas tipologias de auditoria, conhecidas como externas, nomeadamente a de segunda parte (efetuada por um cliente aos seus fornecedores ou subfornecedores) e a de terceira parte (efetuada por um organismo externo independente). De salientar que as auditorias externas não substituem as auditorias internas. (40,41,42)

A realização de auditorias visa verificar, periodicamente, se os métodos obedecem aos requisitos do sistema de gestão e da norma ISO/IEC 17025:2017. Os resultados dessas mesmas auditorias, principalmente as não conformidades, fornecem informações extremamente pertinentes não só para avaliar o sistema de gestão da entidade e as atividades de ensaios e calibração, mas também para proceder às revisões e retificações necessárias, ou seja, funciona como uma ferramenta essencial, de confiança e eficácia, de apoio à prática quotidiana, auxiliando a empresa a melhorar o seu desempenho. O recomendado, ainda que não seja um protocolo totalmente obrigatório, é que as mesmas sejam realizadas no mínimo com uma periodicidade anual, devendo, para tal, ser executado um planeamento cuidado e detalhado das ações a realizar. (40,41,42)

A realização de auditorias internas num dado laboratório assume, assim, uma importância preponderante dada a possibilidade de identificação e/ou correção de não conformidades assumindo o cumprimento contínuo dos critérios expressos no certificado de acreditação. (40)

As auditorias internas são da responsabilidade do laboratório⁷ e podem ser executadas por elementos do próprio laboratório (desde que esteja evidenciado que possuem competências técnicas para o âmbito a auditar e para os métodos envolvidos) ou por elementos externos com aptidões para as atividades desenvolvidas pela empresa. O planeamento é a base de uma auditoria eficaz. Nesse sentido, um plano de auditoria deve ser executado de forma a que esteja expresso quais os critérios da auditoria, que funções serão auditadas, datas, horário e equipa de auditores, devendo incidir sobre todos os elementos que compõem o sistema de gestão. Na preparação de uma auditoria, a pessoa, ou a equipa, responsável deve ter acesso prévio a documentos pertinentes, manuais, relatórios anteriores e registos do departamento a ser auditado para verificar se estão em conformidade com os requisitos. Preferencialmente deverá ser o responsável técnico da qualidade a proceder à auditoria, porém a mesma pode ser executada por qualquer outro técnico qualificado (treinado para tal) de forma singular ou com apoio de um elemento da equipa de auditores. Os auditores não devem auditar as suas próprias atividades sendo que, na impossibilidade de tal acontecer, os gestores devem assegurar que as atividades dos auditores também sejam avaliadas por elementos pré-nomeados. (40,41,42)

O processo de auditoria deve ser iniciado com uma reunião de apresentação prévia onde são abordados os procedimentos a serem executados, o cronograma, os critérios a auditar e a pertinência, para a empresa, dos dados resultantes do procedimento. Posteriormente, numa vertente prática, a auditoria desenvolve-se através de um rol de atividades que pretendem identificar os pressupostos normativos, que inclui a formulação de questões, técnicas de observação dos procedimentos, examinação das instalações e avaliação dos registos de forma a que o/a auditor/a determine a conformidade com o sistema de gestão, baseando-se na documentação respetiva (manuais de qualidade, procedimentos técnicos, ficheiros de teste dos equipamentos, entre outros) e a forma como estes estão a ser implementados. Os dados devem ser recolhidos sem formular juízos de valor ou promover insegurança aos elementos auditados, de forma a serem os mais eficientes e fidedignos possíveis. O término da auditoria deve resultar na compilação de registos que devem incluir a identificação dos requisitos auditados, pessoal envolvido, documentos e registos analisados, assim como as atividades auditadas e os métodos utilizados (presencial, simulação, avaliação de registos, observação, entre outros). Para a formulação dos mesmos, sob a forma de um relatório, o auditor deve rever, cuidadosamente, quais as informações relevantes e pertinentes, particularmente não conformidades e manifestar recomendações para melhorias. Os aspetos positivos também devem ser incluídos como forma de promover a continuidade de boas práticas. (40,41,42)

As não conformidades detetadas devem ser reportadas ao responsável do departamento auditado de forma a serem implementadas ações corretivas e estratégias de atuação. Sempre que for

⁷ A iniciativa de programar e concluir uma auditoria é da responsabilidade dos gestores do laboratório.

constatada uma não conformidade que possa comprometer o resultado de uma calibração, ensaio ou inspeção, a atividade correspondente deve ser descontinuada até que a ação corretiva apropriada seja tomada e comprovadamente bem-sucedida. Após a apresentação das mesmas na reunião final, deve ser estabelecido um prazo, pelo responsável do departamento, para que sejam definidas e aplicadas as medidas que assegurem os critérios normativos. Todos os registos resultantes da auditoria devem ser arquivados por um determinado período de forma a servir de apoio a todos os elementos intervenientes. (42,43)

8. Os fungos na Indústria Alimentar

Os países industrializados deparam-se com um problema crescente de contaminação de alimentos, de etiologia microbiológica, representando um problema de saúde pública, com enormes efeitos socioeconómicos. Para responder a este desafio, os governos têm aumentando o investimento na pesquisa de novas e inovadoras estratégias de controlo relativamente ao crescimento microrgânico prejudicial. Este esforço internacional contínuo visa prevenir perdas anuais brutas de cerca de 30% assim como minimizar a incidência de patologias de origem alimentar que tem vindo a despoletar a um ritmo acelerado, apesar da introdução das normas HACCP e da promulgação de regulamentos de segurança alimentar. (44,45,46)

A contaminação microbiana, em qualquer fase do processo de plantação, colheita, manipulação e comercialização é evidente, e este problema tanto pode ser despoletado pelo produtor, vendedor ou até mesmo pelo consumidor. Nas últimas décadas muitas foram as discussões sobre as principais causas que podem estar na base da situação, considerada por muitos uma questão de saúde pública global. Concluiu-se que as alterações das práticas agrícolas e alimentares, o aumento das exportações e as alterações sociais, como a permuta dos hábitos de consumo e a mobilização social, são as mais comuns. Além destas, vários fatores como as características físico-químicas, as práticas de manuseamento e confeção, os intervenientes pré-colheita (água da rega, solo ou sementes contaminadas), as condições de armazenamento (temperatura, humidade e atmosfera) e as condições de transporte também foram realçadas como potenciais influenciadores da população microbiana. Alguns estudos acrescentam que ambientes muito quentes e húmidos ou eventos climáticos extremos aumentam o risco de deterioração por contaminação. Sem descurar, por todas estas possíveis causas, o risco de contaminação cruzada. (44,45,46,47)

Os fungos (bolores e leveduras) desempenham várias funções nos ecossistemas e são abundantes no meio ambiente, sendo os que mais contribuem para a contaminação dos alimentos ao longo da cadeia alimentar e, a deterioração que instiga nos consumíveis, provoca perdas significativas para a indústria, ainda que muitos deles sejam essenciais no campo da biotecnologia e tenham distintas aplicações industriais, como na produção de certos fármacos, alimentos e bebidas. A

evolução destes microrganismos permite-lhes colonizar em ambientes diversos e hostis, tornando-os resistentes aos fungicidas convencionais, o que, consecutivamente, aumenta a sua incidência no meio ambiente, infetando colheitas e deteriorando alimentos. De facto, os fungos constituem uma ameaça à segurança alimentar, destruindo cerca de 25% dos produtos agrícolas através de doenças ou deterioração do mesmo. Inclusive podem provocar estragos nos estados mais avançados de produção sendo que, segundo Davies *et al* (2021), cerca de 10% dos produtos colhidos são destruídos no período pós colheita. Esta deterioração é associada a efeitos negativos da qualidade organolética dos produtos, tais como o sabor, o aroma, a estética, entre outros. Porém, o comportamento da população microbiana, da qual resulta a alteração das características do produto, é maioritariamente determinado pelas propriedades do alimento. (44, 45, 48)

Alguns fungos podem colocar em risco a vida humana e animal, pela produção de metabolitos tóxicos, as micotoxinas, que representam um perigo para a saúde, originando infeções oportunistas, em hospedeiros suscetíveis, sendo que, em alguns casos, atuam como agente cancerígeno. A sua aptidão à infeção advém da capacidade das mesmas em se manterem estáveis perante alterações de temperatura e denotarem tolerância a pH ácido, resultado da evolução microbiana e adaptação ao meio envolvente. (49)

Apesar do uso de conservantes e da otimização das medidas de higienização reduzirem a deterioração alimentar, certos fungos denotam elevada resistência e podem persistir em condições, por vezes, consideradas inóspitas. Muitas estratégias são praticadas há centenas de anos, contudo, nas últimas décadas demonstram-se inadequadas no combate à contaminação por fungos e outros microrganismos, e tanto o crescimento populacional como as alterações climáticas trazem novos desafios a estas mesmas estratégias. No sentido de aumentar a segurança alimentar é essencial controlar todos as variáveis e encontrar soluções, reais ou potenciais, para o problema (Imagem 5). (44,45,50)

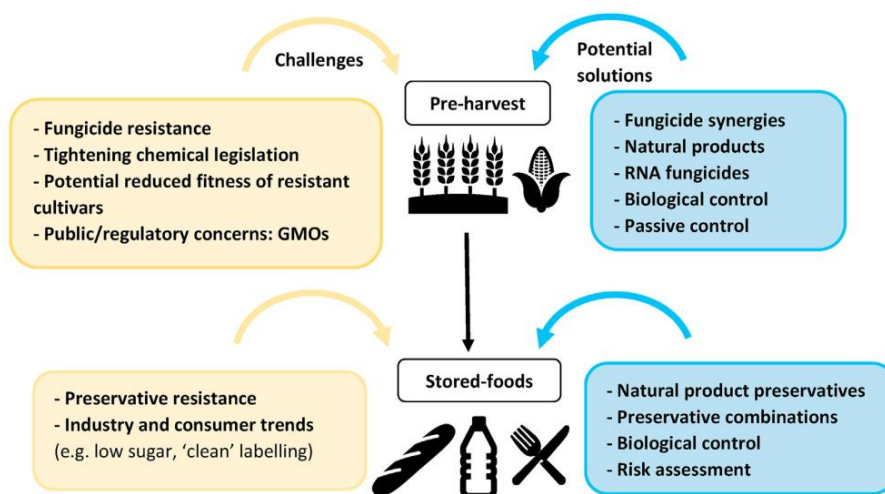


Imagem 5 – Desafios e soluções perante contaminação por fungos. (Fonte: Davies *et al*, 2021)

Reconhecer e compreender a fonte, e os microrganismos envolvidos, contribui consideravelmente para o controlo das colonizações indesejadas. Para minimizar o efeito provocado por essas colónias, dever-se-á otimizar os procedimentos padronizados e potenciar boas condutas de produção. Muitas dessas práticas, originárias do esforço internacional, dos países industrializados, visam a redução da atividade da água do alimento, o processamento térmico, a adição de conservantes, a redução dos níveis de oxigénio no embalamento (adoção de embalamento a vácuo ou através de processos de atmosfera controlada) e o armazenamento refrigerado. A implementação de cada uma destas estratégias pode não ser adequada a todos os grupos de fungos, pelo que a conjugação de duas ou mais irá reduzir a quantidade de microrganismos que podem deteriorar os produtos o que, para além de garantir a segurança alimentar, permite restringir a contaminação para taxas aceitáveis. (47,51)

A água é essencial à existência e a sua escassez é um fator que limita a vida. Apenas organismos especialmente adaptados podem lidar com essa possibilidade no seu ambiente natural. Desta forma, uma estratégia de conservação alimentar visa a redução da água através de processos de secagem e/ou adição de solutos concentrados, como sal ou açúcar. Reduzir a atividade da água para valores de 0.9 previne o crescimento da maioria das bactérias. Contudo, muitos fungos, conseguem crescer em valores de atividade de água de 0.8, aproximadamente, sendo que, foram registados fungos que crescem em valores de atividade da água a rondar os 0.61. Esses microrganismos são denominados de xerofílicos, ou osmofílicos se conseguirem crescer em ambientes altamente concentrados. (50,52,53, 54)

Determinadas estratégias de processamento alimentar podem libertar o produto da presença de fungos, ou, em contrapartida reduzir a colonização do mesmo. Contudo, com tempo suficiente, os fungos que resistem podem eventualmente desenvolver-se e deteriorar o alimento. (44,55)

8.1. ISO 21527.2:2008

A ISO 21527-2:2008⁸ "*Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal – Método horizontal para enumeração de leveduras e bolores – Parte 2: Técnica de contagem de colónias em produtos com atividade de água menor ou igual a 0,95*" engloba as condutas normativas que especificam o procedimento técnico no que concerne à enumeração de bolores xerófilos e leveduras osmófilas em produtos destinados ao consumo humano e alimentação para animais, cuja a atividade da água seja inferior ou igual a 0,95 (Tabela V). Porém, a presente norma não é passível de ser aplicada a recursos cuja atividade da água apresenta valores iguais ou inferiores a 0,60, não possibilitando, desta forma, a enumeração de esporos e a deteção de micotoxinas. (56)

⁸ Tradução de "*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95*"

Tabela V – Atividade da água conforme as matrizes

| Water activity (a_w) | Food examples/matrices |
|--------------------------|---|
| $\geq 0,95$ | Alimentos altamente perecíveis (frutas frescas e enlatadas, legumes, carne, peixe), leite, enchidos cozidos, pães, alimentos que contenham até 4 % de sacarose ou 7 % de NaCl (sal) |
| $\geq 0,91$ | cheddar, carnes curadas, concentrados de frutas contendo 55% de sacarose ou 12% de NaCl (sal) |
| $\geq 0,87$ | Salsicha fermentada, pão de ló, queijo seco, margarina, alimentos contendo 65% de sacarose ou 15% de NaCl (sal) |
| $\geq 0,80$ | Concentrados de frutas, leite condensado, "syrup" (xarope), farinha, bolos com alto teor de açúcar, leguminosas com 15% a 17% de humidade |
| $\geq 0,75$ | Geleia, marmelada, frutas cristalizadas, maçapão, "marshmallows" |
| $\geq 0,65$ | Aveia em flocos com 10 % de humidade, geleia, melaço, frutos secos |
| $\geq 0,60$ | Frutos secos com 15% a 20% de humidade, caramelo, mel, barras de cereais, ração para cães, alimentos granulados, grãos, cereais e produtos à base de cereais |
| $\geq 0,50$ | Noodles com 12% de humidade, especiarias com 10% de humidade |
| $\geq 0,40$ | Ovo em pó com 5 % de humidade, torrão |
| $\geq 0,30$ | Biscoitos, bolachas, crostas de pão com 3 % a 5 % de humidade, molho desidratado |
| $\geq 0,03$ | Leite em pó com 2% a 3% de humidade, sopas desidratadas, café solúvel |

Na prática, a preparação das amostras submetidas aos ensaios laboratoriais obedece a um protocolo bem definido, que deverá ser cumprido de forma a evitar resultados erróneos (Imagem 6). A água peptonada a 0.1% surge como o meio utilizado para a preparação da suspensão inicial e respetivas diluições. Esta escolha é justificada pela potenciação do crescimento microbiano, uma vez que as peptonas são utilizadas como fonte de carbono, nitrogénio, vitaminas e minerais. Paralelamente, denotam, também, um efeito tensioativo, auxiliando na diminuição do choque osmótico, o que preserva, consequentemente, a integridade morfológica e celular microbiana. Uma vez executada a suspensão inicial, procede-se à inoculação no meio seletivo DG18 (*Dichloran Glycerol Agar*), com recurso a um método de espalhamento, pois, comparativamente ao método de incorporação, promove um crescimento mais uniforme e

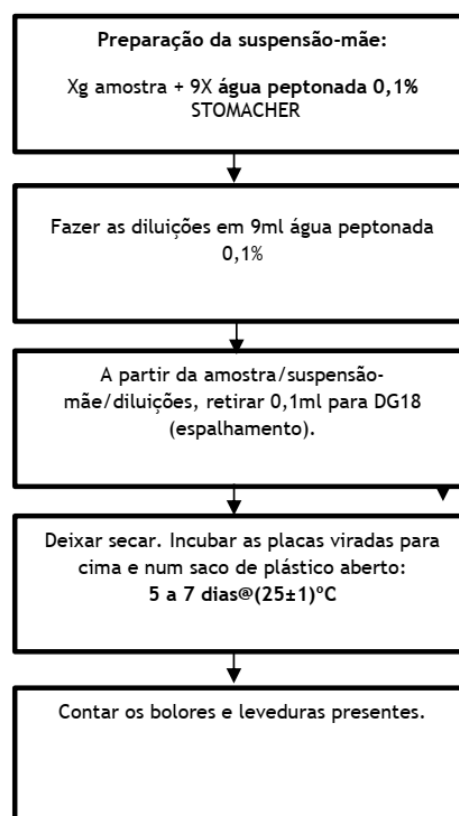


Imagem 6 – Fluxograma da ISO 21527-2:2008 (Fonte: Silliker, 2022)

isolado das culturas fúngicas. Na sua constituição o DG18 contém glucose (como fonte de carbono), triptona (que fornece nitrogénio), vitaminas e minerais, dicloran (que atua como antifúngico que inibe o desenvolvimento de fungos de propagação rápida, minorando o tamanho das suas colónias) e cloranfenicol, um antibiótico que impede o crescimento bacteriano. Posteriormente, a esta solução, é

adicionado glicerol, numa concentração máxima de 18%, o que promove a redução da atividade da água no meio. (56,57)

9. Vinicultura

Nos tempos modernos, a vinicultura representa uma das indústrias que mais contribui para a economia dos países industrializados e enfrenta desafios diários que ameaçam não só a qualidade do vinho como a sua comercialização. (58)

O vinho é o resultado de um processo bioquímico, e ecológico, complexo que se inicia com a vindima, continua com os processos de fermentação, envelhecimento (em castas próprias) e engarrafamento. Os microrganismos são o cerne do processo de vinificação, tanto para o bem como para o mal, uma vez que os processos bioquímicos e a interação entre bactérias, vírus e fungos desempenham um papel fundamental no produto final, dado que podem afetar a qualidade do vinho. A composição química do mesmo depende igualmente da ação de cada um deles, isto porque podem afetar as características da uva antes da colheita e durante a fermentação e, concomitantemente, metabolizam a frutose, e outros componentes, em etanol, dióxido de carbono e diversos produtos secundários que, em conjunto, contribuem para o carácter individual do vinho. Logo, é seguro afirmar que todas as espécies envolvidas têm um papel importante na composição química, ainda que as leveduras assumam um papel mais fulcral por serem responsáveis pela condução da fermentação alcoólica. (59,60)

Muitos fatores afetam a ecologia microbiana da produção de vinhos, das quais a composição química do sumo da uva e os processos de fermentação são os mais significativos. As leveduras e as bactérias lácticas são os microrganismos que mais intervêm neste processo no que concerne à fermentação alcoólica e malolática, respetivamente. Em ecossistemas microbianos complexos, que denotam diferentes espécies e linhagens, existe a possibilidade de ocorrer interação entre estes, o que também determina a ecologia final do produto. (60,61)

A fermentação alcoólica é um processo biomecânico que ocorre de forma espontânea, por processos sequenciais, produzidos por diferentes cadeias de leveduras presentes nos cachos das uvas, nas adegas ou selecionadas de acordo com alguns fatores. A fermentação malolática corresponde a uma fermentação bacteriana que transforma ácido málico em ácido láctico e dióxido de carbono, sendo as bactérias lácticas responsáveis pelo processo, maioritariamente, pertencentes às espécies *Oenococcus* e *Lactobacillus plantarum*. Durante a fermentação malolática, as bactérias consomem as fontes de carbono residual, tornando-as inacessíveis para os microrganismos que podem deteriorar e alterar as propriedades organolépticas do vinho. Este tipo de fermentação é considerada secundária no processo de vinificação, contudo promove a estabilidade microbiana e melhora a acidez do vinho. (61)

Em termos microbiológicos salientam-se três fases nas quais os microrganismos podem prevalecer no processo de vinificação e influenciar a qualidade do produto final. A primeira fase, envolve a matéria prima, onde a microflora natural é afetada indiretamente por condições externas como a variedade da uva, o seu estado na colheita e a sua saúde, a temperatura, a chuva, o solo e a utilização de inseticidas e fungicidas. Tal significa que as uvas enviadas para a adega nem sempre se encontram nas melhores condições o que pode afetar a biodiversidade. De salientar, igualmente, que as uvas interagem diretamente com o equipamento vinícola que, se não apresentar as melhores condições de higienização surge como inoculador de microrganismos repercutindo-se no sumo da uva. A segunda fase pode ocorrer durante a fermentação. O sumo de uva, nesta etapa, contém a flora natural do fruto combinada com a flora proveniente da adega e dos equipamentos. A composição do sumo (pH baixo e alto teor açúcar e ácido) conjugado com a adição de dióxido de enxofre cria um ambiente propício ao desenvolvimento de leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica. Muitos microrganismos podem crescer, e desenvolver, no mosto⁹ pelo que a introdução de determinadas estirpes de leveduras, previamente selecionadas, como a *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias lácticas, como as *Oenococcus*, podem controlar a ação prejudicial das mesmas. Estas espécies são eficientes na conversão de açúcar em etanol e ácido málico em ácido láctico, o que suprime o desenvolvimento de outros fungos e bactérias. Na terceira fase, após a fermentação, o dano do vinho pode ocorrer na garrafa, ou mesmo, durante o armazenamento em barris. Nesta etapa as regras sanitárias da adega devem ser escrupulosamente cumpridas e torna-se absolutamente crítica a redução dos níveis de oxigénio e a utilização de agentes antimicrobianos, em dosagens controladas, de forma a garantir um produto estável e resistente a leveduras e bactérias. Os fungos também podem assumir um papel contaminante quando presentes nas rolhas de cortiça ou nos barris de armazenamento. (58,59,62)

A presença de microrganismos, inclusive os desejáveis, durante todo o processo de produção de vinhos, carece sempre de uma avaliação cuidada, na necessidade de atuar de forma a proteger a qualidade do produto e promover a segurança para o consumidor. Identificar e reconhecer os potenciais riscos e comportamentos microbianos é uma das estratégias de prevenção mais eficazes. *Toit e Pretorius* (2000) referem ser crucial compreender em que condições determinados microrganismos podem causar contaminação do vinho, assim como alterações no sabor, odor e cor na presença de certas condições. Compreendendo estes processos será possível combater eficazmente a contaminação do vinho e desenvolver novos métodos de conservação. (59,60)

As interações envolvidas nos processos de produção vinícola, particularmente na fermentação do sumo de uva para vinho, através da atividade microbiana, produzem metabolitos primários e

⁹ Sumo das uvas frescas adocicado, resultante da pesagem/prensagem da fruta, composta essencialmente por água (70-85%) e elementos determinantes no processo de fermentação alcoólica, no sabor, acidez e aroma.

secundários que alteram as características organoléticas do produto final, tais como o aroma e o paladar, tornando-o menos apetecível para o consumidor ou, na pior das hipóteses, impróprio para consumo. (63)

O sabor do vinho é uma percepção sensitiva única que varia de indivíduo para indivíduo, dependendo tanto da experiência do consumidor como da composição química do mesmo, sendo esta última considerada a base da resposta sensorial e, que por sua vez é determinada por vários fatores, já referidos anteriormente, como a variedade da uva, as condições geográficas, as condições vitícolas do cultivo da uva, a ecologia microbiana, os processos de fermentação e as próprias práticas vinícolas. A resposta definitiva é o resultado de interações quimiosensoriais complexas difíceis de prever dada a influência de todos os fatores envolvidos ao longo do processo. As propriedades organoléticas do vinho resultam de vários compostos, geralmente resultante do metabolismo das leveduras, tais como álcoois superiores, ácidos orgânicos, éteres, aldeídos, ácidos gordos e compostos sulfurados. Em determinadas situações podem surgir subprodutos do metabolismo que afetam as propriedades do vinho e, conseqüentemente a sua qualidade. Uma das alterações com maior incidência, e que permanece como um desafio para a indústria, é a denominada “odor, ou sabor, a rolha” que afeta negativamente a experiência e aceitabilidade do consumidor e deprecia as propriedades do vinho. Este é, de facto, um problema sério que as indústrias enfrentam, sendo vulgarmente identificado como um odor, ou sabor, a terra, mofo, humidade, madeira, fumado ou a fenol que mascara o paladar e o aroma natural do vinho, afetando a sua qualidade e inviabilizando a sua venda e consumo. Vários estudos demonstram que este efeito é da responsabilidade da cortiça, e reflete o resultado da produção de determinados compostos voláteis, que surgem no vinho, tendo a sua origem na rolha. (59,60,61,64,65)

As rolhas de cortiça são, desde há séculos, o vedante de eleição para as garrafas de vinho dado as inúmeras aplicabilidades da matéria prima, porém representam, igualmente, um dos fatores que influencia negativamente as propriedades do vinho, particularmente porque alguns necessitam de envelhecer na garrafa. A cortiça representa a casca do sobreiro (*Quercus suber L¹⁰*) sendo constituída essencialmente por polissacarídeos (celulose e hemicelulose), suberina, lignina, extratos (como os triterpenos) e compostos inorgânicos, denotando propriedades particulares, das quais se destacam a térmica, acústica, compressível, viscoelástica, impermeável para gases e líquidos, reciclável, biodegradável e com alta resistência à abrasão. A suberina, presente na parede celular da cortiça, por se tratar de uma substância cerosa com propriedades impermeabilizantes é a responsável por conceder a capacidade de alta resistência à degradação e a baixa permeabilidade do material. Industrialmente, a cortiça é utilizada em abundância em ilimitadas aplicações para a produção de

¹⁰ O crescimento da árvore é lento e denota uma alta capacidade de regeneração, sendo, desta forma, a sua exploração industrial, e comercial, sustentável.

produtos com valor desde rolhas, roupas e adereços, mobiliário, revestimentos, calçado, material desportivo, isolante, entre muitas outras. (63,64,66)

O odor a rolha, ou odor de cortiça, regista uma ocorrência considerável, o que afeta negativamente a indústria e representa uma questão perentória para produtores, vendedores e consumidores. Vários estudos laboratoriais relatam distintos compostos, como agentes etiológicos deste problema, tais como anisóis, guaiacol, geosmina, pirazinas, sesquiterpenos e compostos alifáticos. Contudo nenhum é mais citado do que os haloanisóis, sendo o mais incidente o 2,4,6-tricloroanisol (TCA), um metabolito fúngico com odor a mofo que se forma através da biometilação do 2,4,6-triclorofenol (TCP). Outros haloanisóis, como o 2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA), o pentacloroanisol (PCA) e o 2,4,6-tribromoanisol (TBA), também podem ser encontrados, ainda que em menor incidência. Estes compostos são normalmente produzidos por metilação microbiana – uma reação química onde intervêm diversos microrganismos – dos seus halofenóis (presentes na casca dos sobreiros) durante a produção e armazenamento de rolhas utilizadas para engarrafar o vinho. Consequentemente transitam da rolha para o interior da garrafa, produzindo o sabor a rolha. Como referido anteriormente, outros compostos voláteis foram, igualmente, identificados na rolha, alterando as propriedades organolépticas do vinho. O guaiacol¹¹ é responsável pelo aroma a fenol ou a fumado, a geosmina pelo aroma forte a mofo e a terra, já os compostos 1-octeno-3-ol e 1-octeno-3-ona são responsáveis por um aroma equiparável ao cogumelo enquanto que o composto 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina promove um aroma leve de bolor. Vários autores afirmam que a terminologia de odor/sabor a rolha só deve ser aplicada nos casos de contaminação do vinho com aroma a bolor e/ou mofo. (60,61,63,64,65)

Nos anos recentes, os vinicultores estão cada vez mais atentos ao crescimento de bolores nas rolhas do vinho. Os bolores, enquanto organismos aeróbicos, são bastante intolerantes ao álcool, contudo a espécie *Penicillium* surge como exceção, tendo sido relatada a sua presença em níveis de álcool com um volume aproximado dos 16%. Em alguns casos, fragmentos de mofo em vinhos envelhecidos resultam, provavelmente, de uma transferência em etapas anteriores de processamento ou do contacto com equipamentos, ou recipientes de armazenamento contaminados. Os fungos filamentosos que crescem nas porosidades da cortiça, como parte da microflora natural, ou por contaminação, em suma, são os principais responsáveis pelas alterações do aroma e sabor do vinho, contudo as leveduras e as bactérias também podem, e devem ser implicadas no problema. (58,60)

¹¹ Este composto também tem sido associado à contaminação de sumos de fruta, bebidas à base de fruta e leite achocolatado.

9.1. ISO 10718:2015

A ISO 10718:2015¹² “Caracterização de rolhas de cortiça de reduzida carga microbiana por contagem das unidades formadoras de colónias (ufc) de bolores, leveduras e bactérias, suscetíveis de extração e de crescimento em meio alcoólico” corresponde à norma que determina a metodologia a utilizar para enumerar as colónicas microbianas (bolores, leveduras e bactérias) que eventualmente possam ser identificadas em rolhas de cortiça, e que denotam capacidade de desenvolvimento em meio alcoólico, sendo que, em determinadas condições, podem ser extraídas durante os três meses subsequentes à entrega. A presente normativa abrange todos os tipos de rolhas de cortiça, aptas a serem utilizadas, desde que os processos de higienização e acondicionamento inerentes tenham sido garantidos, ou seja, a todos os tipos de rolhas em que as condições assépticas e herméticas foram respeitadas. (67)

Numa vertente adicional a norma específica, de igual modo, os valores limite das unidades formadoras de colónias submetidas a ensaios analíticos incluídos no documento. Para serem consideradas rolhas com baixo teor de germes, os resultados obtidos devem estar concordantes com os intervalos de valor infra: (67)

- <10 ufc de bactérias por rolha;
- <10 ufc bolores e leveduras por rolha;

A metodologia utilizada para enumerar leveduras, bolores e bactérias incide sobre procedimentos de incubação, em meios de cultura específicos, após extração com recurso a uma solução alcoólica com a adição de ácido tartárico (Imagem 7). Seguidamente procede-se a uma técnica de filtração por membrana. Os reagentes e meios de cultura utilizados encontram-se expressos na Tabela VI. (67,68,69,70)

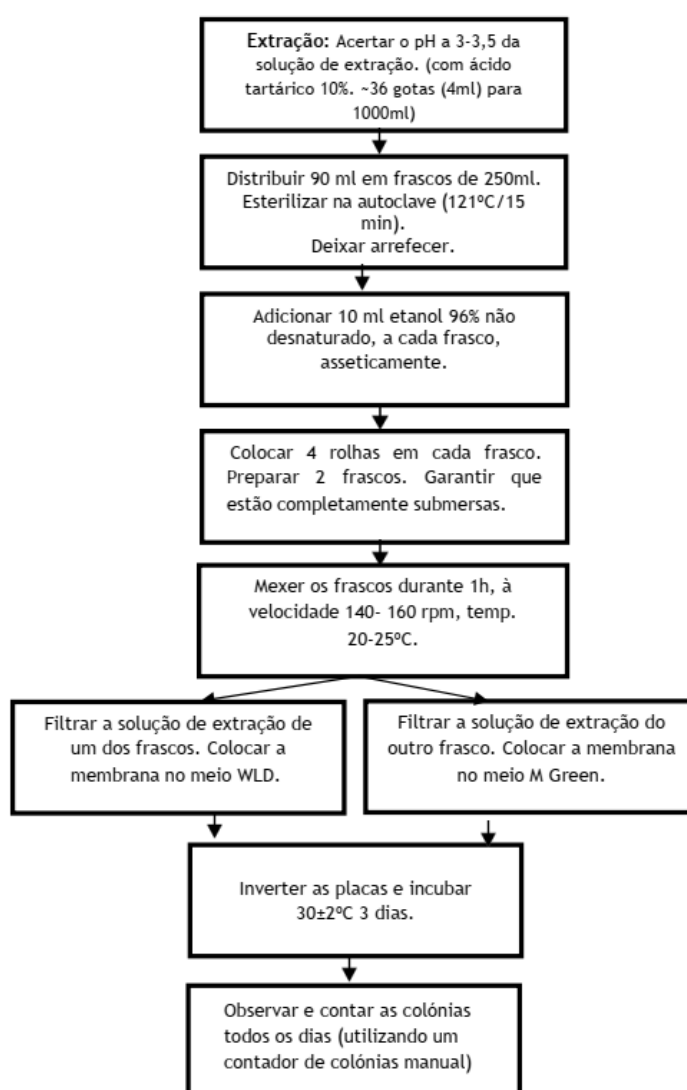
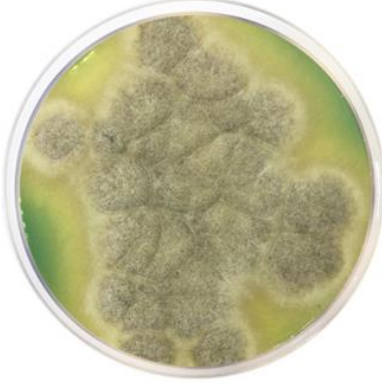



Imagem 7 – Fluxograma da ISO 10718:2015. (Fonte: Silliker, 2018)

¹² Título Original: Cork stoppers – Characterization of a low-in-germs stopper, through the enumeration of colony-forming units of yeasts, moulds and bacteria, capable of both being extracted and growing in alcoholic medium

| Solução de extração (solução de Ringer, ácido tartárico e álcool a 96%) | | | |
|--|-------|--|--------|
| <p>- Solução de Ringer apresenta propriedades isotónicas, ou seja, os sais que constituem a solução fomentam o equilíbrio osmótico do meio, certificando a integridade morfológica e celular dos microrganismos.</p> <p>- O ácido tartárico ajusta o pH entre 3-3,5, e juntamente com o álcool simulam a composição do vinho.</p> | | | |
| MGreen Agar | | | |
| Composição em g/L | | | |
| Dextrose | 50 | Agar | 15 |
| Verde de Bromocresol | 0,026 | Caseína peptona | 5 |
| Gelatina peptona | 5 | Sulfato de Magnésio | 2,1 |
| Fosfato de potássio | 2 | Tiamina | 0,05 |
| Extrato de levedura | 9 | Diastase | 0,05 |
| <p>A gelatina e caseína peptona fornecem nitrogénio, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais para o crescimento microbiano. O extrato de levedura é fonte de vitaminas. A dextrose é fonte de carbono e energia. O agar é o agente solidificante. O fosfato de potássio é o agente tampão. O sulfato de magnésio, a tiamina e a diastase fornecem iões, minerais e nutrientes. O verde de bromocresol é o indicador de pH que facilita a visualização e contagem de colónias fúngicas (leveduras e bolores verdes). Os produtos finais do crescimento microbiano difundem no meio, reduzindo o pH e tornando-o amarelo. O crescimento bacteriano é inibido pelo pH ácido.</p> | |  | |
| <i>Imagem 8 - Colónias típicas de bolores no meio MGreen (Fonte: Condalab, 2020)</i> | | | |
| WLD Agar | | | |
| Composição em g/L | | | |
| Dextrose | 50 | Agar | 20 |
| Verde de bromocresol | 0,022 | Cloreto de cálcio | 0,125 |
| Cicloheximida | 0,004 | Cloreto de ferro | 0,0025 |
| Sulfato de magnésio | 0,125 | Sulfato de Manganésio | 0,0025 |
| Fosfato de potássio | 0,55 | Cloreto de potássio | 0,425 |
| Triptona | 5 | Extrato de levedura | 4 |
| <p>A triptona fornece nitrogénio, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais para o crescimento microbiano. A dextrose é fonte de carbono e energia. O extrato de levedura é uma fonte de vitaminas. O fosfato de potássio é o agente tampão. O cloreto de cálcio, de potássio e férrico proporcionam os iões necessários ao equilíbrio osmótico. O sulfato de manganésio e magnésio são fontes de catiões. O verde de bromocresol é o indicador de pH. O agar é o agente solidificante. A adição de cicloheximida inibe o crescimento de bolores e leveduras, ao mesmo tempo que permite a proliferação bacteriana (estas apresentam-se brancas).</p> | |  | |
| <i>Imagem 9 - Colónias típicas de bactérias no meio WLD. (Fonte: Condalab, 2020)</i> | | | |

10. Metodologia

A metodologia consiste nos princípios e normas utilizadas com o intuito de desenvolver as melhores estratégias com vista ao alcance dos objetivos propostos. Define, de forma sistemática, os métodos utilizados e os caminhos percorridos ao longo do trabalho.

No presente projeto foram realizados dois procedimentos distintos: a validação secundária, ou verificação, da ISO 21527-2:2008 – “*Técnicas de contagem de colónias em produtos com atividade de água igual ou inferior a 0.95*” e a auditoria técnica realizada ao “método das rolhas” de acordo com a norma ISO 10718:2015.

Na primeira parte deste trabalho foi executada uma validação secundária de um método. Para o efeito, tendo por base a norma ISO supracitada, foram preparadas 54 amostras, entre 23 de fevereiro e 14 de maio de 2022, de consumíveis alimentares com atividade de água compreendida entre 0.60 e 0.95. Na planificação do procedimento, de entre o abrangente universo de matrizes alimentares, foram selecionados os produtos mais representativos do quotidiano da Silliker Portugal S.A.¹³, com base na Tabela V (no ponto 7.1). Uma vez selecionados, procedeu-se à realização de 208 ensaios, dos quais 198 foram contaminados artificialmente com os microrganismos de referência *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus caesiellus* e os restantes 10 mantiveram-se sem contaminação.

A preparação das amostras respeitou os pressupostos da norma ISO 21527-2:2008 e o protocolo de validação da Silliker Portugal S.A.. Tal facto significa que o estudo das amostras foi efetuado em dias díspares e por distintos analistas, potenciando uma maior variação nas condições operacionais ao longo do tempo (Imagem 10). Contudo, o procedimento é equiparável a cada técnico, ou seja, deve aplicar o mesmo procedimento, desde a suspensão inicial até à contagem final das colónias, tendo por base as práticas diárias.

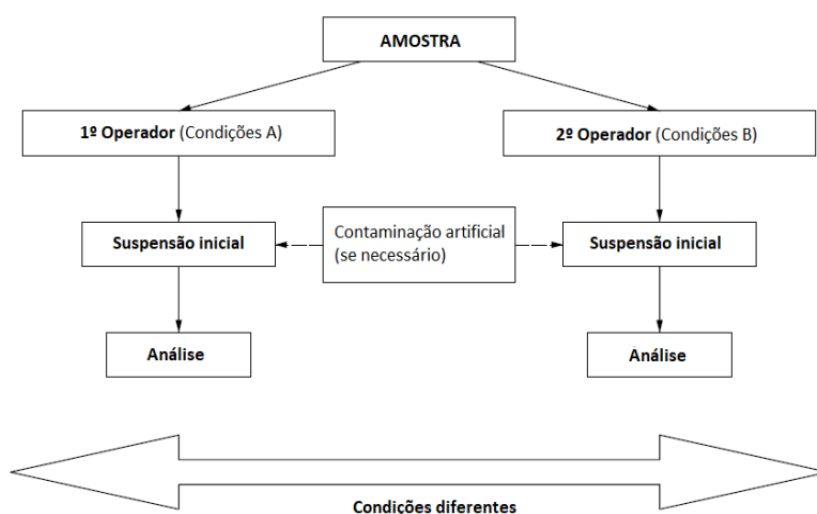


Imagem 10 – Metodologia de Precisão Intermédia (Fonte: Silliker, 2021)

¹³ Alimentos de consumo humano (aveia, farinhas, geleias, leguminosas, manteiga, marmelada, pastelarias, rebuçados, xaropes e leite condensado) e alimentos para animal. (Fonte: Silliker, 2021)

Na preparação da amostra, cada analista retira uma porção da amostra original e procede à concretização da suspensão inicial (A e B) numa proporção 1:10, neste caso concreto 10g de amostra para 90ml de água peptonada a 0.1%. Consecutivamente procedeu-se às diluições (10^{-1} à 10^{-5}) em 9ml de água peptonada 0.1% e retirou-se, da suspensão inicial, 0.1ml para o meio DG18, operando a técnica de espalhamento. Após secar, as placas foram colocadas, em saco plástico aberto, e viradas para cima, em incubação por 5 dias a 25°C (± 1). Findado o tempo procedeu-se à contagem de colónias, de bolores e leveduras, presente nas placas (≤ 150).

Na segunda parte do presente trabalho procedeu-se a uma auditoria técnica, um procedimento que, segundo a Silliker Portugal S.A. (2019), consiste numa auditoria realizada “...preferencialmente por um analista (técnico de laboratório) aos ensaios.”. Tal procedimento consistiu na observação de distintos analistas do Departamento de Microbiologia, entre os dias 13 e 18 de Junho, durante a execução técnica do método protocolado na norma ISO 10718:2015. Para o efeito utilizou-se uma *checklist* interna (ANEXO I), que incidiu sobre os parâmetros essenciais a serem auditados. Para abranger de forma mais criteriosa os pressupostos da auditoria, as técnicas de observação ocorreram em todos os momentos de operacionalização da metodologia, ou seja, na preparação dos meios e na execução da técnica de análise. Em paralelo foi realizada a auditoria vertical que consiste na rastreabilidade dos resultados obtidos decorrentes do método validado. Em suma, visa a avaliação de um boletim analítico, já emitido, e pretende determinar a eficácia do Sistema de Gestão e do sistema de rastreabilidade dos dados gerados pelo técnico.

A metodologia incidiu essencialmente nos pressupostos supracitados e proporcionou a possibilidade de responder aos objetivos predefinidos pela obtenção de dados essenciais à operacionalização dos dados, discutidos no capítulo infra, e à formulação de conclusões pertinentes ao desenvolvimento sustentável da empresa.

11. Resultados e Discussão

11.1. Validação do Método

O laboratório, na sua generalidade, com o intuito de reconhecer que um dado método é adequado à utilização prevista, segue um protocolo de verificação, tendo por base o impresso IQ.78 – Validação de métodos. O mesmo deverá conter evidências preponderantes para os ensaios analíticos, sendo estas discriminadas nos pontos subsequentes.

11.1.1. Cálculo Precisão Intermédia

A precisão intermédia, como definida anteriormente, compreende a precisão avaliada sobre a mesma amostra (no mesmo laboratório e mesmo método), tendo em conta a variação de determinadas condições. No presente trabalho, para a sua determinação foram concretizados 16 ensaios, cujas amostras foram contaminadas artificialmente, com o recurso a materiais de referência, e preparadas segundo os pressupostos da ISO 21527-2:2008 (descrita no ponto 7.1 do presente documento). As tabelas VII e VIII traduzem os dados que serviram de base para o cálculo do desvio padrão de reprodutibilidade, sendo os mesmos tratados com recurso à folha de Cálculo Microsoft® Excel (IQ.101 e IQ.116). Para cada microrganismo foi determinada a precisão intermédia, utilizando o mesmo processo, porém produzindo resultados díspares.

Tabela VII – Dados para o cálculo do desvio padrão de reprodutibilidade para bolores xerófilos

| Amostra | Xa (ufc/g) | Xb (ufc/g) | log ₁₀ (Xa) | log ₁₀ (Xb) | S _{Ri} ² (logX _a – logX _b) | Média (\bar{x}) |
|---------|---------------|---------------|------------------------|------------------------|--|------------------------|
| 1 | 1,4E+03 | 1,2E+03 | 3,15 | 3,06 | 0,0040 | 3,11 |
| 2 | 1,2E+03 | 1,4E+03 | 3,07 | 3,13 | 0,0020 | 3,10 |
| 3 | 1,1E+03 | 1,2E+03 | 3,05 | 3,07 | 0,0001 | 3,06 |
| 4 | 1,4E+03 | 1,2E+03 | 3,15 | 3,07 | 0,0032 | 3,11 |
| 5 | 1,4E+03 | 1,0E+03 | 3,15 | 3,00 | 0,0115 | 3,08 |
| 6 | 1,4E+03 | 1,2E+03 | 3,14 | 3,07 | 0,0027 | 3,11 |
| 7 | 4,2E+02 | 3,5E+02 | 2,62 | 2,54 | 0,0034 | 2,58 |
| 8 | 2,3E+02 | 3,9E+02 | 2,36 | 2,59 | 0,0277 | 2,47 |
| 9 | 4,2E+02 | 2,3E+02 | 2,62 | 2,36 | 0,0351 | 2,49 |
| 10 | 4,2E+02 | 3,9E+02 | 2,62 | 2,59 | 0,0004 | 2,61 |
| 11 | 3,5E+02 | 2,2E+02 | 2,54 | 2,34 | 0,0199 | 2,44 |
| 12 | 3,4E+03 | 1,5E+03 | 3,53 | 3,19 | 0,0570 | 3,36 |
| 13 | 3,7E+03 | 1,5E+03 | 3,57 | 3,19 | 0,0731 | 3,38 |
| 14 | 3,4E+03 | 3,7E+03 | 3,53 | 3,57 | 0,0010 | 3,55 |
| 15 | 1,5E+03 | 2,6E+03 | 3,19 | 3,42 | 0,0269 | 3,31 |
| 16 | 3,4E+03 | 2,6E+03 | 3,53 | 3,42 | 0,0056 | 3,47 |
| n = 16 | | | | | | |
| | | | | | Σ S _{Ri} ² : | 0,2737 |
| | | | | | sR: | 0,1308 |
| | | | | | Σ \bar{x} : | 48,21 |

Tabela VIII - Dados para o cálculo do desvio padrão de reprodutibilidade para leveduras osmófilas

| Amostra | Xa (ufc/g) | Xb (ufc/g) | log ₁₀ (Xa) | log ₁₀ (Xb) | S _{Ri} ² (logX _a - logX _b) | Média (\bar{x}) |
|---------|---------------|---------------|------------------------|------------------------|--|------------------------|
| 1 | 7,2E+04 | 8,7E+04 | 4,86 | 4,94 | 0,0036 | 4,90 |
| 2 | 9,6E+04 | 8,4E+04 | 4,98 | 4,92 | 0,0019 | 4,95 |
| 3 | 7,2E+04 | 9,6E+04 | 4,86 | 4,98 | 0,0082 | 4,92 |
| 4 | 8,7E+04 | 8,4E+04 | 4,94 | 4,92 | 0,0002 | 4,93 |
| 5 | 7,2E+04 | 8,4E+04 | 4,86 | 4,92 | 0,0022 | 4,89 |
| 6 | 8,7E+04 | 9,6E+04 | 4,94 | 4,98 | 0,0009 | 4,96 |
| 7 | 7,2E+04 | 6,5E+04 | 4,86 | 4,82 | 0,0008 | 4,84 |
| 8 | 5,7E+04 | 6,5E+04 | 4,76 | 4,81 | 0,0013 | 4,78 |
| 9 | 7,2E+04 | 5,7E+04 | 4,86 | 4,76 | 0,0048 | 4,81 |
| 10 | 7,2E+04 | 6,5E+04 | 4,86 | 4,81 | 0,0011 | 4,83 |
| 11 | 6,5E+04 | 5,7E+04 | 4,82 | 4,76 | 0,0017 | 4,79 |
| 12 | 7,9E+04 | 8,4E+04 | 4,90 | 4,92 | 0,0003 | 4,91 |
| 13 | 6,7E+04 | 8,4E+04 | 4,83 | 4,92 | 0,0045 | 4,88 |
| 14 | 7,9E+04 | 6,7E+04 | 4,90 | 4,83 | 0,0025 | 4,86 |
| 15 | 8,4E+04 | 7,5E+04 | 4,92 | 4,87 | 0,0012 | 4,90 |
| 16 | 7,9E+04 | 7,5E+04 | 4,90 | 4,87 | 0,0003 | 4,89 |
| n = 16 | | | | | | |
| | | | | | Σ S _{Ri} ² : | 0,0355 |
| | | | | | sR: | 0,0471 |
| | | | | | Σ \bar{x} : | 78,03 |

Calculando o desvio padrão relativo (Tabela IX) para os bolores xerófilos e leveduras osmófilas, obteve-se uma percentagem de 0,27% e 0,06%, respetivamente.

Tabela IX - Cálculo do desvio padrão relativo

| | Fórmula | Cálculo |
|---------------------|---|--|
| Bolores Xerófilos | $\%RSD = \frac{S_R}{\Sigma \bar{x}} \times 100$ | $\%RSD = \frac{0,1300}{48,21} \times 100 = 0.27\%$ |
| Leveduras Osmófilas | | $\%RSD = \frac{0,0471}{78,03} \times 100 = 0.06\%$ |

Tendo por base o valor de referência¹⁴ de 2,5%, sendo os resultados obtidos inferiores, podemos afirmar que a dispersão de resultados em relação à média é pequena.

11.1.2 Incertezas

A estimativa da incerteza foi calculada com base no desvio padrão de reprodutibilidade, resultando nos dados apresentados na Tabela X. A incerteza deverá ser expressa na mesma unidade que o valor do resultado final, ou seja, em ufc/g, uma vez que se trata de matrizes sólidas, e arredondada para

¹⁴ Segundo o PCQ.33 – Validação de métodos da Silliker Portugal S.A.

dois Algarismos significativos. De salientar que a operação de arredondamento foi concretizada na fase final do cálculo de forma a evitar o efeito de erros cumulativos.

Tabela X – Estimativa da incerteza para bolores xerófilos e leveduras osmófilas

| | Fórmula | Cálculos | Expressão de resultados ¹⁵ |
|----------------------------------|--------------------|---------------------|---|
| $U_{\text{bolores xerófilos}}$ | $U = 2 \times S_R$ | $U = 2 \times 0,13$ | $1,7 \pm 0,26 \log 10 \text{ (ufc/g)}$ |
| | | | $5,0 \times 10^2 \text{ ufc/g, } 2,7 \times 10^2 - 9,1 \times 10^2$ |
| $U_{\text{leveduras osmófilas}}$ | $U = 2 \times S_R$ | $U = 2 \times 0,05$ | $1,7 \pm 0,10 \log 10 \text{ (ufc/g)}$ |
| | | | $5,0 \times 10^2 \text{ ufc/g, } 4,0 \times 10^2 - 6,3 \times 10^2$ |

Como referido anteriormente, a incerteza surge como o parâmetro associado ao resultado de uma medição e, simultaneamente, caracteriza a dispersão de valores possíveis de serem atribuídos à mensuranda. Desta forma, na emissão de um boletim analítico, o resultado final será complementado com a estimativa da incerteza, o que significa que há uma probabilidade de 95% do resultado verdadeiro de bolores xerófilos e leveduras osmófilas, do produto, estar dentro deste intervalo.

11.1.3. Exatidão

A avaliação da exatidão, isto é, a comparação entre o valor do laboratório e o valor aceite como verdadeiro, adveio da participação no ensaio interlaboratorial “LGC-Ronda QMS 310-amostra 05F”, no dia 23 de fevereiro de 2022. A Tabela XI reúne os dados obtidos nesse mesmo ensaio.

Tabela XI – Valores de “z-score” resultantes do ensaio interlaboratorial

| Laboratory | Matrix | Target | Method | Z-SCORE | PASS / FAIL |
|------------|---------|------------------|-------------|---------|-------------|
| POR-OPO | Oatmeal | Osmophilic yeast | ISO 21527-2 | 0,76 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Osmophilic yeast | ISO 21527-2 | 0,46 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Osmophilic yeast | ISO 21527-2 | 0,42 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Osmophilic yeast | ISO 21527-2 | 0,66 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Osmophilic yeast | ISO 21527-2 | 0,32 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Osmophilic yeast | ISO 21527-2 | 0,67 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Osmophilic yeast | ISO 21527-2 | 0,33 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Xerophilic mould | ISO 21527-2 | 0,53 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Xerophilic mould | ISO 21527-2 | 0,65 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Xerophilic mould | ISO 21527-2 | 0,95 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Xerophilic mould | ISO 21527-2 | 0,33 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Xerophilic mould | ISO 21527-2 | 0,39 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Xerophilic mould | ISO 21527-2 | 0,53 | P |
| POR-OPO | Oatmeal | Xerophilic mould | ISO 21527-2 | 0,45 | P |

¹⁵ A título exemplificativo.

Analisando a tabela é possível constatar que o valor de z-score é inferior a 2, logo o resultado do laboratório é considerado aceitável, demonstrando, desta forma, que o mesmo denota um bom desempenho para o método em estudo.

11.1.4. Carta de amplitudes

A determinação do critério de precisão (CP) compreendeu a execução de 15 ensaios em duplicado, sendo os resultados obtidos processados, e analisados, com recurso à folha de cálculo Microsoft® Excel, tendo por base o descrito no ponto 5.4.

Atendendo aos gráficos, constata-se que a linha central, representada a azul, corresponde à média das amplitudes, enquanto que a linha superior, representada a vermelho, simboliza o critério de precisão. Uma vez que são necessários apenas 15 dados para o cálculo do CP, importa salientar que, visualizando o gráfico, os pontos excedentes representam o desempenho do método, assim como, dos próprios analistas. Analisando o gráfico, concluiu-se que os resultados obtidos são satisfatórios, na medida em que nenhuma das amplitudes ultrapassa o CP.

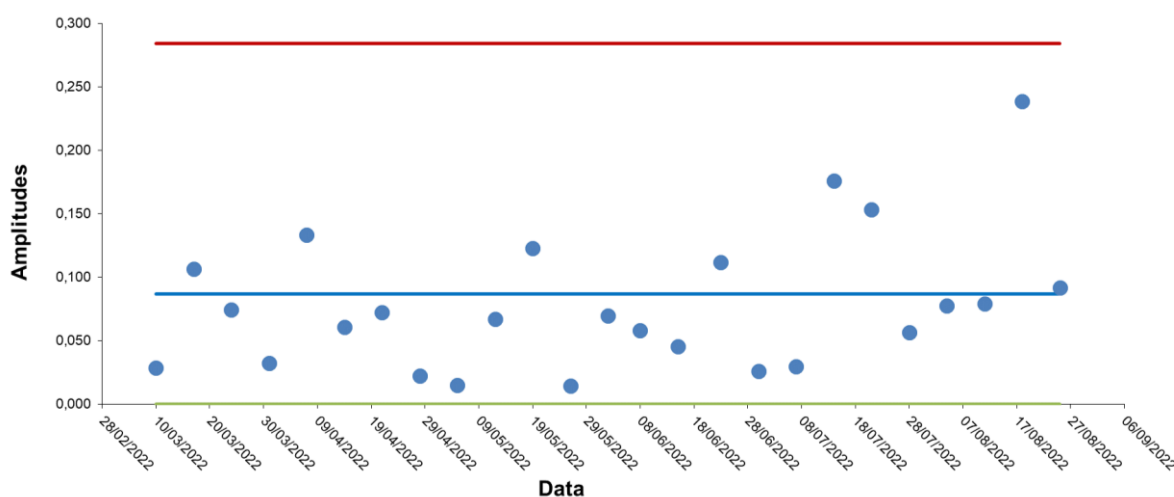


Gráfico II - Carta de amplitudes de bolores xerófilos

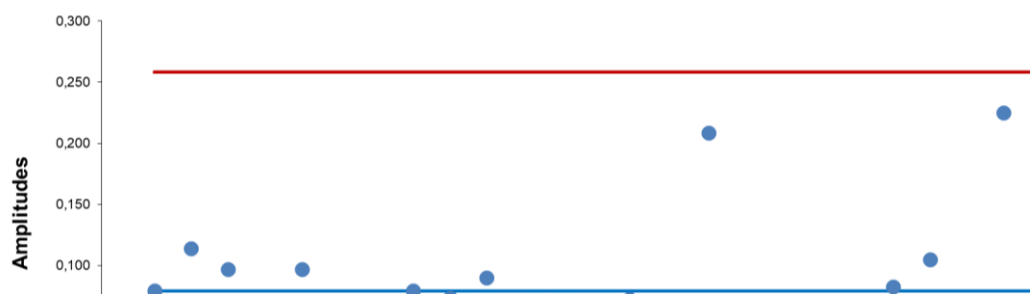


Gráfico III - Carta de amplitudes para leveduras osmófilas

Gráfico IV - Carta de amplitudes para leveduras osmófilas

Gráfico V - Carta de amplitudes para leveduras osmófilas

Gráfico VI - Carta de amplitudes para leveduras osmófilas

11.1.5. Características de desempenho

A avaliação das características de desempenho permite determinar, de forma generalizada, a credibilidade do método, a sua fiabilidade e a qualidade dos resultados apresentados. Para o efeito, procedeu-se à execução de um total de 208 ensaios, recorrentes de 54 amostras, dos quais se registaram 198 positivos e 10 brancos. Tais procedimentos refletem a realidade do laboratório tendo por base os cálculos de determinados parâmetros, nomeadamente a sensibilidade, especificidade, eficiência, seletividade, taxa de falsos positivos e a taxa de falsos negativos. De salientar que para a operacionalização dos dados, sintetizados na tabela XII, recorreu-se à folha de cálculo Microsoft® Excel (IQ.78).

Tabela XII - Dados para o cálculo dos parâmetros de desempenho da ISO 21527-2:2008

| Amostras | Ensaio | Ensaio de amostras contaminadas artificialmente | Ensaio de amostras não contaminadas | Ensaio de amostras contaminadas naturalmente |
|----------|--------|---|-------------------------------------|--|
| 54 | 208 | 198 | 10 | 0 |

| | | Ensaio presuntivo | | |
|---------------------------------|---|---------------------------|---------------------------|-------|
| | | + | - | |
| Confirmados/ verdadeiramente | + | (a) Verdadeiros positivos | (b) Falsos negativos | a + b |
| | - | (c) Falsos positivos | (d) Verdadeiros negativos | c + d |
| | | a + c | b + d | n |
| | | Ensaio presuntivo | | |
| | | + | - | |
| Confirmados/ verdadeiramente | + | (a) 198 | (b) 0 | a + b |
| | - | (c) 0 | (d) 10 | c + d |
| | | a + c | b + d | n=208 |

Dos 198 ensaios, referentes a amostras contaminadas artificialmente, considerou-se a globalidade dos mesmos como ensaios presuntivos, porém os 10 ensaios, de amostras não contaminadas, estabeleceram-se como ensaios não presuntivos.

11.1.5.1. Sensibilidade

A sensibilidade é essencial para as análises laboratoriais, uma vez que exhibe a capacidade de um determinado método em detetar o microrganismo alvo, isto é, a totalidade de positivos na contagem presuntiva. A sua base de cálculo, tendo por base a fórmula, é traduzida pelo número de ensaios presuntivos, considerados verdadeiros, sobre o somatório desses mesmos ensaios com os números

de ensaios não presuntivos, porém verdadeiros. Esta equação é multiplicada por 100, e o resultado expresso em percentagem:

$$\frac{a}{(a+b)} \times 100 \leftrightarrow \frac{198}{(198+0)} \times 100 = 100\%$$

Neste caso em particular, a sensibilidade, em ambos os métodos apresentou um valor de 100%. Saliendo que, em termos gerais o presente parâmetro deve denotar um valor superior a 90%, conclui-se que, para o método em avaliação, estamos perante uma sensibilidade adequada.

11.1.5.2. Especificidade

O parâmetro de especificidade é considerado díspar da sensibilidade uma vez que possibilita, por sua vez, detetar a fração de total de negativos. Para o efeito emprega-se a fórmula representada, sendo determinada pelo número de ensaios não presuntivos verdadeiros, sobre a soma desses com o número de ensaios presuntivos, porém falsos. Uma vez mais o resultado da equação é multiplicado por 100 e expresso em percentagem:

$$\frac{d}{(d+c)} \times 100 \leftrightarrow \frac{10}{(10+0)} \times 100 = 100\%$$

Analisando os dados supracitados, conclui-se que o método denota uma especificidade satisfatória, na medida em que se obteve um resultado superior a 80%, pressuposto essencial para a sua validação.

11.1.5.3. Taxa de Falsos Positivos e Taxa de Falsos Negativos

A taxa de falsos positivos e falsos negativos representam dois princípios essenciais no que concerne à validação de métodos de ensaio, uma vez que representam uma das variáveis mais preponderantes na adulteração involuntária de resultados, tornando-os incoerentes, aquando da análise microbiológica.

A taxa de falsos positivos revela a fração de dados que representa os organismos não-alvo, sendo calculada, pelo número de ensaios presuntivos falsos, sobre o somatório do número de ensaios presuntivos verdadeiros com o número de ensaios presuntivos falsos. De forma análoga aos parâmetros supracitados, o resultado, da equação, é multiplicado por 100 e expresso em percentagem:

$$\frac{c}{(a+c)} \times 100 \leftrightarrow \frac{0}{(198+0)} \times 100 = 0\%$$

No que concerne à taxa de falsos negativos, a mesma representa a fração de resultados negativos que demonstram ser colónias alvo. O seu cálculo é determinado pela soma do número de ensaios não considerados presuntivos, porém verdadeiros, com o número de ensaios não presuntivos verdadeiros, sob os ensaios não considerados presuntivos, verdadeiros. De igual modo, a equação, é multiplicada por 100 e o seu resultado expresso em percentagem:

$$\frac{b}{(b+d)} \times 100 \leftrightarrow \frac{0}{(0+10)} \times 100 = 0\%$$

Atendendo aos cálculos advindos dos ensaios realizados, a percentagem de falsos positivos e negativos correspondeu a 0%, concluindo-se que os resultados podem ser encarados como fiáveis e credíveis.

11.1.5.4. Seletividade

A seletividade representa a aptidão de um dado método em diferenciar, de forma inequívoca, o organismo alvo, sem interferência, de potenciais microrganismos presentes da amostra (microrganismos não-alvo). A equação determina a percentagem de seletividade alcançada, sendo obtida pela divisão dos ensaios alvos com o total de ensaios, multiplicada por 100:

$$\frac{a}{n} \times 100 \leftrightarrow \frac{198}{208} \times 100 = 95\%$$

Uma vez que o valor obtido é superior a 10%, conclui-se que o método denota uma seletividade satisfatória, sendo considerado válido.

11.1.5.5. Eficiência

A eficiência de um método é obtida através do somatório do número de ensaios presuntivos verdadeiros e o número de ensaios não presuntivos, igualmente verdadeiros, sobre o total de ensaios. Esta equação é multiplicada por 100 e o seu resultado expresso em percentagem:

$$\frac{(a+d)}{n} \times 100 \leftrightarrow \frac{(198+10)}{208} \times 100$$

Na generalidade dos 208 ensaios executados, decompostos em 198 ensaios de amostras contaminadas artificialmente e 10 ensaios de amostras não contaminadas, a eficiência obtida, para ambos os métodos, obteve uma valorização de 100%, concluindo-se que os métodos apresentam-se como totalmente eficientes para os objetivos propostos.

13. Bibliografia

1. Kritikos, A. Entrepreneurs and their impact on jobs and economic growth. IZA World of Labor. 2014. Available from: <https://wol.iza.org/articles/entrepreneurs-and-their-impact-on-jobs-and-economic-growth/long>.
2. Henrekson, M. How labor market institutions affect job creation and productivity growth. IZA World of Labor 2014. Available from: <https://wol.iza.org/articles/how-labor-market-institutions-affect-job-creation-and-productivity-growth/long>.
3. Silliker, S.A.. Quem somos: Resumo histórico da Silliker Portugal.: Mérieux NutriSciences Corporation; 2022 [Acedido em 15/08/22 em <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/quem-somos/>].
4. ISO 9000:2015 Quality management systems – Fundamentals and vocabulary. 4 ed: International Organization for Standardization; 2015.
5. ISO 9001 – What does it mean in the supply chain?. 3 ed: International Organization for Standardization; 2016.
6. Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho. Jornal Oficial da União Europeia; 2004
7. ISO/IEC 17025:2017, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization; 2017.
8. IPAC. Guia para a aplicação da NP EN ISSO/IEC 17025:2018 – OGC001. Instituto Português de Acreditação; 2018.
9. Agyei-Baffour P, Sekyere KB, Addy EA. Policy on Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) and adherence to food preparation guidelines: a cross sectional survey of stakeholders in food service in Kumasi, Ghana. BMC Res Notes. 2013;6:442.
10. Henry CJ, Xin JL. Application of Hazard Analysis Critical Control Point in the local manufacture of ready-to-use therapeutic foods (RUTFs). Food Nutr Bull. 2014;35(2 Suppl):S57-63.
11. Kim JH, Nam KC, Jo C, Lim DG. Perception of the HACCP system operators on livestock product manufacturers. J Anim Sci Technol. 2014;56:19.
12. Wallace CA. HACCP-based food safety management systems: great in theory but can we really make them work in practice? Perspect Public Health. 2014;134(4):188-90.
13. Organização Pan-Americana da Saúde. Codex Alimentarius: Higiene dos Alimentos – Textos Básicos / Organização Pan-Americana da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Food and Agriculture Organization of the United Nations. – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2006.
14. Silliker, S.A.. Manual da Qualidade. 15ª ed. 2021

15. Wehr HM, Frank JF. Standard Methods for the examination of dairy products. 17th ed: American Public Health Association; 2004.
16. Pires AR. Sistema de Gestão da Qualidade – Ambiente, Segurança, Responsabilidade Social, Indústria e Serviços. 2ª ed. Lisboa: Edições Sílabo, Lda.; 2016.
17. Guedes JF, Cordeiro JJ. Abordagem Simplificada à NP EN ISSO 9001:2015 – Sistemas de Gestão da Qualidade – Requisitos. XZ Consultores, SA; 2017.
18. Río-Rama MdC, Sereno – Ramirez A, Durán-Sanchez A, Álvarez-García J. Factores de éxito para la implantación de la norma UNE-EN-ISO 9001:2008. TMQ – Techniques, Methodologies and Quality; 2015
19. Khodabocus F, Balgobin K. Implementation and practical benefits of ISO/IEC 17025: 2005 in a testing laboratory. University of Mauritius Research Journal. 2011;17:27–60.
20. Siva, Vanajah et al. “The support of Quality Management to sustainable development: a literature review.” Journal of Cleaner Production 138 (2016): 148–157.
21. Farinha L, Lourenço J, Caroço C. Guidelines for the Implementation of a Quality Management System in Industrial Companies.: Romanian Review Precision Mechanics; 2016.
22. P. Karipidis, K. Athanassiadis, S. Aggelopoulos, E. Giompliakis. Factors affecting the adoption of quality assurance systems in small food enterprises. Food Control. 2009;20(2):93–8.
23. Passmore, S.M. Laboratory Management Systems: Accreditation Schemes. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Academic Press, 2014.
24. IPAC. Questões Frequentes: Instituto Português de Acreditação; [Acedido a 24/07/22 em <http://www.ipac.pt/faqs/faqs.asp>].
25. Decreto-Lei n.º 140/2004. In: Economia Md, editor.: Diário da República; 2004. [Acedido a 24/07/22 em: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/278973/details/maximized>].
26. Regulamento (CE) n.º 765/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho. Jornal Oficial da União Europeia; 2008 .
27. RELACRE. Guia RELACRE 6 – Acreditação de Laboratórios de ensaios microbiológicos. 2ª ed: Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal; 2007.
28. IPAC. Regulamento Geral de Acreditação – DRC001. Instituto Português de Acreditação; 2022.
29. IPAC. Procedimento para Acreditação de Laboratórios – DRC005. Instituto Português de Acreditação; 2019.
30. M. Eleftheriadou and K. C. Tsimillis (Eds), Eurachem guide: Accreditation for Microbiological Laboratories, Second edition (2013), ISBN: 978-91-87017-92-6. Available from www.eurachem.org.

31. EUROLAB. Cook Book nº1 – Seleção, verificação e validação de métodos. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal;2017.
32. Silliker S.A. PCQ.33 – Procedimento de Controlo de Qualidade: Validação de Métodos em Microbiologia. 2021
33. ISO 16140-1:2016 – Microbiology of the food chain – Method validation – Part 1: Vocabulary. International Organization for Standardization;2016.
34. ISO 16140-3:2021 – Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. International Organization for Standardization; 2021.
35. RELACRE. Guia RELACRE 3 – Validação de resultados em Laboratórios Químicos. 1ªed: Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal; 1996
36. ISO 19036:2019 – Microbiology of the food chain – Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. International Organization for Standardization; 2019
37. Silliker S.A. Measurement Uncertainty in Quantitative Microbiology Analyses: AS-SOP_015.2. Merieux NutriSciences;2009.
38. RELACRE. Guia RELACRE 29 – Estimativa de Incerteza em ensaios microbiológicos de águas. 1ªed: Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal; 2016.
39. RELACRE. Guia RELACRE 9 – Alguns exemplos de carta de controlos em Laboratórios de Análise Química. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal; 1998.
40. EUROLAB. Cook Book nº9 – Auditorias Internas. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal;2018.
41. EUROLAB. Cook Book nº10 – Auditorias Internas, o auditor. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal;2018.
42. Silliker S.A. PGQ13.3 – Procedimento de Gestão da Qualidade: Auditorias.2018.
43. EUROLAB. Cook Book nº14 – Auditorias Internas, relatório da auditoria. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal;2018.
44. Davies, CR, et al. Evolving challenges and strategies for fungal control in the food supply chain. Fungal Biology Reviews; 2021. p. 15–26.
45. Avery SV, Singleton I, Magan N, Goldman GH. The fungal threat to global food security. Fungal Biol. 2019;123(8):555–7.
46. Li S, Marquardt RR, Abramson D. Immunochemical detection of molds: a review. J Food Prot. 2000;63(2):281–91.
47. Hernández A, Pérez-Nevado F, Ruiz-Moyano S, Serradilla MJ, Villalobos MC, Martín A, et al. Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages? Int J Food Microbiol. 2018;286:98–110.

48. Benedict K, Chiller TM, Mody RK. Invasive Fungal Infections Acquired from Contaminated Food or Nutritional Supplements: A Review of the Literature. *Foodborne Pathog Dis.* 2016 Jul;13(7):343-9.
49. Kępińska-Pacelik J, Biel W. Alimentary Risk of Mycotoxins for Humans and Animals. *Toxins (Basel).* 2021;13(11).
50. Grant WD. Life at low water activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004;359(1448):1249-66; discussion 66-7.
51. Buzzini P, Turchetti B, Yurkov A. Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around? *Yeast.* 2018;35(8):487-97.
52. Zajc J, Gunde-Cimerman N. The Genus. *Microorganisms.* 2018;6(2).
53. Guyot S, Pottier L, Bertheau L, Dumont J, Dorelle Hondjuila Miokono E, Dupont S, et al. Increased xerotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* during an osmotic pressure ramp over several generations. *Microb Biotechnol.* 2021;14(4):1445-61.
54. Leong SL, Lantz H, Pettersson OV, Frisvad JC, Thrane U, Heipieper HJ, et al. Genome and physiology of the ascomycete filamentous fungus *Xeromyces bisporus*, the most xerophilic organism isolated to date. *Environ Microbiol.* 2015;17(2):496-513.
55. Laranjo M, Córdoba MG, Lemsaddek TS, Potes ME. "Food Microbiology", *BioMed Research International.* 2019.
56. ISO 21527-2:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95. International Organization for Standardization. 2008
57. BOKAR. Technical data sheet of Dichloran Glycerol Agar (DG18). Biokar Diagnostic. 2017
58. Andrii Tarasov and Miguel Cabral and Christophe Loisel and Paulo Lopes and Christoph Schuessler and Rainer J. State-of-the-Art Knowledge about 2,4,6-Trichloroanisole (TCA) and Strategies to Avoid Cork Taint in Wine. In: Antonio Morata and Iris Loira and Carmen G, editor. *Grapes and Wine.* Rijeka: IntechOpen; 2022 [Acedido a 12/07/22 em <https://www.intechopen.com/chapters/81659>].
59. Du Toit, M. & Pretorius, I. S. 2000. Microbial spoilage and preservation of wine : using weapons for nature's own arsenal. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1):74-96.
60. Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol.* 2003;86(1-2):11-22
61. Capozzi V, Garofalo C, Chiriatti MA, Grieco F, Spano G. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol Res.* 2015;181:75-83.
62. Bartle L, Sumbly K, Sundstrom J, Jiranek V. The microbial challenge of winemaking: yeast-bacteria compatibility. *FEMS Yeast Res.* 2019;19(4).

63. Alañón ME, Alarcón M, Díaz-Maroto IJ, Pérez-Coello MS, Díaz-Maroto MC. Corky off-flavor compounds in cork planks at different storage times before processing. Influence on the quality of the final stoppers. *J Sci Food Agric.* 2021;101(11):4735-42.
64. Alvarez-Rodríguez ML, Belloch C, Villa M, Uruburu F, Larriba G, Coque JJ. Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;220(1):49-55.
65. Rico-Munoz E, Samson RA, Houbraken J. Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiol.* 2019;81:51-62.
66. Gonçalves F, Correia P, Silva SP, Almeida-Aguiar C. Evaluation of antimicrobial properties of cork. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(3).
67. ISO 10718:2015: Cork stoppers – Characterization of a low-in-germs stopper, through the enumeration of colony-forming units of yeasts, moulds and bacteria, capable of both being extracted and growing in alcoholic médium. International Organization for Standardization. 2015.
68. Condalab. Technical data sheet MGreen Agar. 2020
69. Condalab. Technical data sheet WLD. 2020
70. Bridson EY. The OXOID MANUAL. 9th Edition ed.OXOID Limited; 2006.