



Instituto Politécnico de Santarém

Escola Superior Agrária de Santarém

Instituto Politécnico de Santarém
2021

ESTUDO DE CONTROLO DA HIGIENIZAÇÃO
DE PRODUTOS DE IV GAMA

Ricardo Filipe Moreira Machado

Estudo do controlo da higienização numa linha de produtos de IV gama

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de
Mestre na área de Tecnologia Alimentar

Ricardo Filipe Moreira Machado

Orientador:

Doutor António José Faria Raimundo

Coorientadora:

Doutora Ana Maria Gomes de Sousa Neves

Santarém 2021/2022



INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM



ESTUDO DO CONTROLO DA HIGIENIZAÇÃO NUMA LINHA DE PRODUTOS DE IV GAMA

**Dissertação apresentada para a obtenção do grau
de Mestre em Tecnologia Alimentar**

Nome do estudante: Ricardo Filipe Moreira Machado

Número do estudante: 180300194

Nome do orientador: António José Faria Raimundo

Grau académico do orientador: Doutoramento

Nome do Coorientadora: Ana Maria Gomes de Sousa Neves

Grau académico do Coorientadora: Doutoramento

Santarém 2021/2022



INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM



“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin.

AGRADECIMENTOS

Agora concluído o mestrado em tecnologia alimentar gostaria de exprimir os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles, que direta ou indiretamente contribuíram para a sua realização, pois sem eles não teria sido possível.

À indústria alimentar portuguesa, pela disponibilidade e oportunidade que uma das suas empresas me deu para realizar este estudo.

À Escola Superior Agrária de Santarém, por ter sido casa, família e tudo o que mais precisei, durante o meu percurso escolar.

Aos meus orientadores, Doutor António Raimundo e à Doutora Ana Neves, pela sua constante orientação e disponibilidade para a realização deste estudo, bem como todo o apoio e esclarecimentos prestados.

Por fim e não menos importante, agradeço à minha família e à minha namorada Susana Antunes que me ajudou a superar este objetivo e a todos os amigos por todo o apoio dado sem os quais não me seria exequível a realização deste curso, tal como, deste trabalho.

Aos meus PAIS, por TUDO!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASAE Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

BP Boas Práticas

BPA Boas Práticas Agrícolas

BPF Boas Práticas de Fabrico

CDC *Centers for Disease Control and Prevention*

CAC *Codex Alimentarius Commission*

EFSA *European Food Safety Authority*

EUFI *European Food Information Council*

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO *Food and Agriculture Organization*

FDA *Food and Drug Administration*

HACCP *Hazard Analysis Critical Control Points*

HMP Hortofrutícolas Minimamente Processados

IFPA *International Fresh-cut Produce Association*

INSA Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

ISO *International Organization for Standardization*

MP Minimamente Processados

NP Norma Portuguesa

OMS Organização Mundial de Saúde

PAHO *Pan American Health Organization*

PMP Produtos Minimamente Processados

SCF *Scientific Committee on Food*

VMP Vegetais Minimamente Processados

WHO *World Health Organization*

RESUMO

O objetivo deste trabalho consistiu em efetuar uma avaliação da contaminação microbiológica em três superfícies de equipamentos após a sua higienização, numa linha de processamento de saladas minimamente processadas.

A par desse objetivo, foram comparados dois métodos microbiológicos distintos, o método convencional e um método alternativo (Hygicult®), que necessitava de ser validado, para demonstrar que o desempenho seria igual ao do método convencional.

No método convencional a análise microbiológica realizada às superfícies não evidenciou contaminações microbiológicas significativas.

No método alternativo a análise microbiológica realizada às superfícies, indicou que a maioria dos pontos analisados não apresentaram contaminações microbiológicas significativas.

A avaliação microbiológica apresentou um nível satisfatório para todas as análises realizadas em todas as superfícies e equipamentos, o que significa que não houve impacto na segurança e higiene do produto final.

Palavras-chave: vegetais minimamente processados; caracterização microbiológica; higiene; Hygicult®.

ABSTRACT

The objective of this work was to carry out an evaluation of microbiological contamination on three equipment surfaces after cleaning, in a minimally processed salad processing line.

For this, two different microbiological methods were compared, the conventional method and an alternative method (Hygicult®), which needed to be validated, to demonstrate that the performance is the same as the conventional method.

In the conventional method, microbiological analysis performed on surfaces did not show significant microbiological contamination.

In the alternative method, the microbiological analysis carried out on surfaces indicated that most of the points analysed did not present significant microbiological contamination.

The microbiological evaluation showed a satisfactory level for all analyzes performed on all surfaces and equipment, which means that there was no impact on the safety and hygiene of the final product.

Keywords: minimally processed vegetables, microbiological characterization, hygiene and safety indicators.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO	10
1 ENQUADRAMENTO	11
1.1 Introdução.....	11
1.2 Objetivo.....	14
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Fluxograma de processamento mínimo de hortícolas	16
2.1.1 Receção da matéria-prima	18
2.1.2 Armazenamento da matéria-prima	19
2.1.3 Preparação da matéria-prima na linha de processamento.....	19
2.1.4 Corte.....	20
2.1.5 Lavagem, Desinfecção e Enxaguamento.....	20
2.1.6 Secagem / escorrimento	22
2.1.7 Mistura (opcional).....	23
2.1.8 Pesagem e embalamento.....	23
2.1.9 Acondicionamento e paletização.....	24
2.1.10 Armazenamento em câmara frigorífica	24
2.1.11 Transporte e distribuição	24
2.2 Epidemiologia e contaminação cruzada	25
2.3 Microrganismos que afetam a qualidade	26
2.3.1 Contagem de Microrganismos a 30°C.....	27
2.3.2 Contagem de bolores e leveduras	28
2.3.3 Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.....	28
2.4 Perigos biológicos que afetam a segurança.....	29
2.5 Microrganismos que afetam a segurança alimentar nos produtos minimamente processados.....	32
2.5.1 <i>Enterobacteriaceae</i>	32
2.5.2 <i>Salmonella</i> spp.....	33
2.5.3 <i>Escherichia coli</i>	34

2.5.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	36
2.5.5	<i>Shigella</i> spp.....	38
2.5.6	<i>Yersinia enterocolitica</i>	39
2.6	Mecanismos de contaminação.....	40
2.7	Mecanismos de prevenção	42
2.8	Métodos de referência vs. métodos alternativos	44
2.8.1	Métodos de referência.....	44
2.8.2	Métodos alternativos.....	44
2.8.2.1	Métodos físicos.....	45
2.8.2.2	Métodos químicos.....	45
2.8.2.3	Métodos moleculares.....	46
2.8.2.4	Métodos imunológicos.....	46
2.9	<i>Kits rápidos Hygicult</i> ®	48
2.10	Métodos de pesquisa e contagem de microrganismos.....	48
2.10.1	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	48
2.10.2	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	49
2.10.3	Contagem de bolores e leveduras	49
2.10.4	Contagem de <i>Escherichia coli</i>	49
2.10.5	Contagem de microrganismos a 30°C.....	50
2.10.6	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	50
2.10.7	Pesquisa e contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.....	50
	CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS	51
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1	Introdução.....	52
3.2	Contaminação das superfícies.....	54
3.2.1	Colheita de amostras para análises convencionais e análises com <i>kits Hygicult</i> ® ...	54
3.2.2	Transporte das amostras para análises convencionais e análises com <i>kits Hygicult</i> ®	54
3.2.3	Análises convencionais.....	55
3.2.4	Superfícies- análises com <i>kits Hygicult</i> ®	56
3.3	Avaliação da contaminação do produto acabado e da matéria-prima	59
3.3.1	Colheita das amostras do produto acabado e da matéria-prima.....	59
3.3.2	Contaminação da água do secador	61
3.4	Valor do pH da água do tanque de desinfecção	61

CAPÍTULO IV – RESULTADOS	62
4 RESULTADOS	63
4.1 Contaminação das superfícies	63
4.1.1 Análises convencionais	63
4.1.2 Análises com kits Hygicult®	64
4.1.2.1 Hygicult®- TPC Microrganismos totais a 30°C	64
4.1.2.2 Hygicult® CF – Coliformes	65
4.1.2.3 Hygicult® E- <i>Enterobacteriaceae</i>	66
4.1.2.4 Hygicult® Eβ -GUR- <i>Enterobacteriaceae</i> – Espécies produtoras da enzima β- <i>glucuronidase</i>	67
4.1.2.5 Hygicult® Y&F- Leveduras e bolores	68
4.2 Contaminação da matéria-prima	69
4.3 Contaminação da água do secador	71
4.4 Valor do pH da água do tanque de desinfecção	71
CAPÍTULO V – DISCUSSÃO	72
5 Discussão dos resultados	73
5.1 Contaminação das superfícies	73
5.1.1 Análises convencionais	73
5.1.1.1 Contagem de microrganismos a 30°C	73
5.1.1.2 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	74
5.1.1.3 Contagem <i>E.coli</i>	74
5.1.1.4 Contagem de bolores e leveduras	75
5.1.1.5 Contagem <i>C. perfringens</i>	75
5.1.1.6 Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	76
5.1.2 Análises com kits Hygicult®	77
5.1.2.1 Hygicult®- TPC Microrganismos totais	77
5.1.2.2 Hygicult®- CF – Coliformes	77
5.1.2.3 Hygicult®- E- <i>Enterobacteriaceae</i>	77
5.1.2.4 Hygicult® Eβ -GUR- <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Enterobacteriaceae</i> – Espécies produtoras da enzima β- <i>glucuronidase</i>	78
5.1.2.5 Hygicult® Y&F- bolores	79
5.1.2.6 Hygicult® Y&F- leveduras	79
5.2 Contaminação da matéria-prima	80
5.2.1 Contaminação do produto acabado	80
5.2.1.1 Contagem de microrganismos a 30°C	80

5.2.1.2	Contagem de <i>Escherichia coli</i>	80
5.2.1.3	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	81
5.2.1.4	Contagem de <i>Clostridium</i> sulfito-redutores	81
5.2.1.5	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	81
5.2.1.6	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	82
5.3	Contaminação da água do secador	82
5.4	Valor do pH da água do tanque de desinfecção	82
5.5	Relação entre o método convencional e o método alternativo nas superfícies analisadas	83
5.5.1	Microrganismos totais a 30°C.....	83
5.5.2	<i>Enterobacteriaceae</i>	84
5.5.3	Espécies produtoras da enzima β - <i>glucuronidase</i>	85
5.5.4	Bolores	86
5.5.5	Leveduras	87
	CAPÍTULO VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
6	Considerações finais.....	90
	CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
7	Referências bibliográficas.....	93

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1	Desinfetantes utilizados no processamento mínimo de frutas e vegetais.	21
Quadro 2	Pontos críticos associados a perigos biológicos.	30
Quadro 3	Bactérias patogénicas associados a hortofrutícolas.....	31
Quadro 4	Descrição das técnicas utilizadas no estudo.	53
Quadro 5	Avaliação de contaminação de superfícies – distribuição/ordem de amostras em cada ponto.....	54
Quadro 6	Parâmetros e métodos utilizados para análise em superfícies.....	55
Quadro 7	Limites e critérios usados para avaliação da contaminação por microrganismos a 30°C e microrganismos indicadores de higiene (INSA, 2019) em ufc/100 cm ² e em ufc/cm ²	55
Quadro 8	Limites e critérios para detetar microrganismos totais, coliformes, <i>Enterobacteriaceae</i> , e as espécies produtoras da enzima β - <i>glucuronidase</i> através da utilização das diversas gamas de Hygicult® nas superfícies de processamento de alimentos, utilizados por Lehto <i>et al.</i> (2011).	58
Quadro 9	Parâmetros e métodos que foram analisados do produto acabado.	59
Quadro 10	Limites e critérios usados para a avaliação da contaminação por microrganismos indicadores de higiene e segurança na matéria-prima.....	60
Quadro 11	Parâmetros analisados e o respetivo método utilizado de análise.....	61
Quadro 12	Resultados obtidos pela análise de superfícies dos equipamentos nas linhas de processamento 3 e 4.....	63
Quadro 13	Resultados de análise de superfície utilizando o kit Hygicult® TPC.....	64

Quadro 14 Resultados de análise de superfície utilizando o kit Hygicult® CF.....	65
Quadro 15 Resultados de análise de superfície utilizando o kit Hygicult® E.....	66
Quadro 16 Resultados de análise de superfície utilizando o kit Hygicult® Eβ -GUR.....	67
Quadro 17 Resultados de análise de superfície utilizando o kit Hygicult® Y&F.	68
Quadro 18 Resultados microbiológicos da matéria-prima antes da lavagem, após a desinfecção e no produto acabado.....	70
Quadro 19 Resultados relativos à contaminação da água do secador de folhas.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Etapas gerais do processamento mínimo de produtos hortofrutícolas (Adptado de Silva et al., 2011).....	17
Figura 2 Percentagem de cloro livre disponível em solução em relação ao pH (Adaptado de Kitinoja e Gorny, 1999).	22
Figura 3 Relação entre o método convencional e o método alternativo nos Microrganismos a 30°C.....	83
Figura 4 Relação entre o método convencional e o método alternativo na Enterobacteriaceae....	84
Figura 5 Relação entre o método convencional e o método alternativo nas espécies produtoras da enzima β- glucuronidase.	85
Figura 6 Relação entre o método convencional e o método alternativo nos bolores.....	86
Figura 7 Relação entre o método convencional e o método alternativo nas leveduras.	87



INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM



CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO

1 ENQUADRAMENTO

1.1 Introdução

De acordo ICIAG *et al.* (2015) e Pasha *et al.* (2014), no século XX, nomeadamente, a partir de 1970 ocorreram algumas alterações na sociedade que geraram mudanças no estilo de vida e nos hábitos alimentares no mundo ocidental, bastante notórias, em comparação com o padrão de consumo da primeira metade do século XX. De acordo com ICIAG *et al.* (2015) e Hernández *et al.* (2014), tais alterações deveram-se a avanços tecnológicos na mecanização agrícola (mudanças na rotina dos produtores que começaram a adequar as tecnologias para o fabrico/distribuição dos alimentos produzidos no campo), emancipação da mulher no mercado de trabalho (menos tempo para a preparação das refeições em casa), desenvolvimento industrial (facilidade para cumprir os requisitos para alimentos processados). Sendo assim, o processamento mínimo surgiu para garantir maior praticidade e menor tempo para a preparação das principais refeições diárias. Segundo Santos e Campos (2007), pode afirmar-se que, anteriormente, os alimentos consumidos eram produzidos e servidos no momento, eram mais saudáveis e tinham um risco muito baixo de contaminação. Segundo Buckley *et al.* (2007), ainda assim, as novas tecnologias geraram não só a mudança de normas e valores sociais como resultaram também num aumento do nível de vida das populações, bem como, numa maior consciencialização dos consumidores relativamente ao valor nutricional dos alimentos, o que levou, conseqüentemente, à necessidade de adaptação da indústria alimentar na disponibilização de novos produtos saudáveis. De acordo com alguns autores, nomeadamente PAHO *et al.* (2016), Santos *et al.* (2012) e Santos e Campos (2007), por esse motivo, atualmente o consumidor pode encontrar no mercado uma gama muito ampla de alternativas, onde as frutas e os vegetais são componentes essenciais universalmente aceites numa dieta saudável. Segundo Ahern *et al.* (2013), a Organização Mundial da Saúde aconselha o consumo de 400 g de vegetais, equivalente a 5 porções por dia como forma de prevenção. Segundo Santos *et al.* (2012), após ter sido abordada a importância dos vegetais tanto para o consumidor como para a OMS, a verdade é que os produtos minimamente processados surgiram devido aos argumentos anteriormente mencionados, onde o valor nutricional é uma realidade de destaque, porém, não deve ser descurado o fator tempo, visto que a ausência do mesmo leva os consumidores a preferirem refeições fáceis, práticas, variadas e com alto valor nutricional. Para os autores Colelli e Elia (2009), o processamento mínimo de hortofrutícolas tem como objetivo fornecer um produto conveniente e de qualidade para o consumidor,

com características semelhantes às do produto fresco, sem perder as suas características nutricionais e sensoriais e com o tempo de durabilidade suficiente desde o início da distribuição até ao consumo.

Segundo Silva e Vieira (2017) e Moldão e Empis (2000), existem as seguintes gamas de produtos: I gama; II gama; III gama; IV gama e V gama. Entende-se por produtos de I gama os produtos frescos e naturais, como hortofrutícolas, carne, peixe, entre outros, que não tenham sofrido qualquer tipo de processamento, sendo que o embalamento é uma forma de proteger os produtos de I gama de danos mecânicos. Por outro lado, os produtos II gama são produtos enlatados e em conserva, podendo ser confeitados, cristalizados ou desidratados. Estes podem ser conservados à temperatura ambiente por períodos de tempo muito longos, por vezes anos. Posteriormente, apareceram os produtos de III gama, trata-se de alimentos congelados que têm a vantagem de se poder conservar durante períodos de tempo muito longos sem que as suas características originais sejam alteradas. Podem apresentar diferentes níveis de transformação, em alguns casos a transformação é mínima, mas ainda assim são englobados nesta gama. Por outro lado, os produtos de IV gama surgem a partir dos produtos de I gama hortofrutícolas após terem sofrido alterações físicas, como operações de lavagem, descasque e corte e tenham sido, posteriormente, acondicionados em atmosfera modificada, de forma a aumentar o tempo de validade, encontrando-se prontos a consumir. Por fim, os produtos de V gama são alimentos pré-cozinhados, prontos a consumir tal como estão ou após breve aquecimento, pois são submetidos a vários processos como a cozedura, pasteurização ou esterilização, de forma a assegurarem estabilidade e segurança após a sua confeção. De todos os mencionados o foco deste estudo será nos produtos de IV gama.

Segundo FAO (2011), o mercado de produtos de IV gama, pela sua comodidade e facilidade de utilização, tem vindo assim a crescer significativamente no mercado Europeu e Mundial. De acordo com Azeredo *et al.* (2011), a segurança e a qualidade microbiológica dos produtos minimamente processados tem sido motivo de preocupação nas últimas décadas devido ao aumento de surtos associados a doenças de origem alimentar e que estejam relacionados ao consumo de vegetais crus. Segundo Baptista e Venâncio (2003) e SCF (2002), a sobrevivência e o crescimento de agentes patogénicos dependem dos fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos, como a composição nutricional e a presença de substâncias antimicrobianas naturais, pH, textura, valor da atividade da água (a_w), a

temperatura e a atmosfera gasosa que envolve o alimento. Conforme Mahajan e Edelenbos (2014), o desafio é encontrar condições, onde a proliferação microbiana e a degradação do vegetal sejam retardadas, para a manutenção da qualidade, aumento do tempo de vida útil do produto, a garantia da segurança e a aceitabilidade por parte dos consumidores. De acordo com Sarantópoulos (2011), para garantir a vida útil dos produtos minimamente processados é necessário um controlo rigoroso de temperatura e embalagem, uma higiene e desinfeção eficientes, bem como, uma preocupação na manutenção da qualidade dos produtos, tendo atenção ao sabor, ao aroma e ao valor nutricional. Segundo Gil *et al.* (2015), o controlo inadequado da temperatura em todas as etapas do processo, a ausência da tecnologia de atmosfera modificada nas embalagens, bem como, a ausência da implementação de ferramentas de qualidade Boas Práticas Agrícolas e de Fabrico, são fatores importantes na indústria de produtos minimamente processados, podendo ser a causa de muitos problemas. Para combater os problemas existem sempre métodos para os solucionar e é exatamente esse o objetivo da desinfeção. Assim sendo, pode dizer-se que a desinfeção corresponde à utilização de agentes químicos e métodos físicos - inócuos para os alimentos e para a saúde humana - para a redução do número de microrganismos. Relativamente aos métodos de controlo microbiológico, de acordo com Gouvêa (2009) e Forsythe (2002), os métodos para deteção de bactérias em alimentos, são frequentemente categorizados em dois grupos: convencionais (ou tradicionais) e rápidos. Os primeiros envolvem a homogeneização da amostra de alimento, etapas de enriquecimento, diluição em série e inoculação em placas com agar para formação de colónias, e posterior contagem das mesmas, sendo estes métodos quantitativos (ufc/g ou ufc/mL). Segundo Forsythe (2002), os métodos rápidos são alternativos aos métodos convencionais e são projetados para obter um resultado em menos tempo. Isto é altamente desejável na indústria alimentar, apesar das técnicas poderem ser mais caras inicialmente e requererem pessoal com alto nível de qualificações. Conforme López-Campos *et al.* (2012), os métodos convencionais requerem vários dias até obtenção de resultados, ao contrário da maioria dos métodos rápidos em que a deteção pode ser feita em algumas horas ou no máximo um dia. No entanto, algumas técnicas rápidas necessitam que se realize um enriquecimento prévio que pode variar de 6 a 48 horas, tornando assim a técnica um pouco mais demorada. A utilização de meios de enriquecimento é bastante vantajosa pois permite que bactérias presentes tenham concentrações reduzidas, que possam multiplicar-se até quantidades possíveis de se detetar por métodos moleculares. A principal desvantagem dos métodos

rápidos face aos métodos tradicionais é que a maioria dos métodos rápidos pode danificar algumas células presentes. Segundo Jay (2006), estes métodos alternativos, que supostamente significam maior rapidez, simplicidade e facilidade de execução, podem ser classificados em 4 grupos diferentes, com base na sua tecnologia: métodos físicos, químicos, moleculares e imunológicos. Apesar de existirem vários grandes grupos destes métodos, no decorrer deste estudo iremos debruçar-nos apenas sobre um, nomeadamente, no método químico, onde, por conseguinte, serão abordados os substratos fluorogénicos. Quando se fala em composto fluorogénico não nos podemos esquecer que o 4-metil-umbeliferona (4-MU), tem sido amplamente explorado para o diagnóstico em microbiologia por apresentar três grandes vantagens: baixa toxicidade; facilidade de hidrólise; e gerar uma intensa fluorescência. Este é o caso do Hygicult®, ou seja, um método que é destinado à análise semi-quantitativa, de modo, a identificar e a controlar a presença de microrganismos em superfícies ou líquidos que possam provocar malefícios para a saúde pública.

1.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho consistiu em efetuar uma avaliação da contaminação microbiológica de algumas superfícies de equipamentos após a sua higienização, numa linha de processamento de saladas minimamente processadas, tentando desta forma averiguar a eficácia da higienização numa linha de produção utilizando dois grupos de métodos de análise microbiológica, com auxílio também da análise à qualidade da água, bem como, na matéria-prima e no produto acabado.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fluxograma de processamento mínimo de hortícolas

De acordo com Cenci *et al.* (2011), no processamento de vegetais estão envolvidas várias operações que têm como objetivo garantir a segurança, qualidade e diminuição de perdas dos mesmos. Assim, é necessário usar manipulação suave para minimizar contusões e outros ferimentos físicos. É, também, importante proteger os produtos de danos físicos e mecânicos, de contaminações físicas, microbiológicas e por insetos, decorrentes, muitas vezes, do manuseamento impróprio da matéria-prima e da falta de higiene dos manipuladores, principalmente, durante os processos de lavagem, de centrifugação e de embalagem.

Segundo Cenci *et al.* (2011), na produção de um produto minimamente processado estão envolvidas várias etapas. Dependendo do tipo de produto, o fluxograma e as descrições das mesmas podem apresentar variações e um maior nível de detalhe. Na Figura 1 estão representados os processos após a entrada na unidade transformadora:

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM

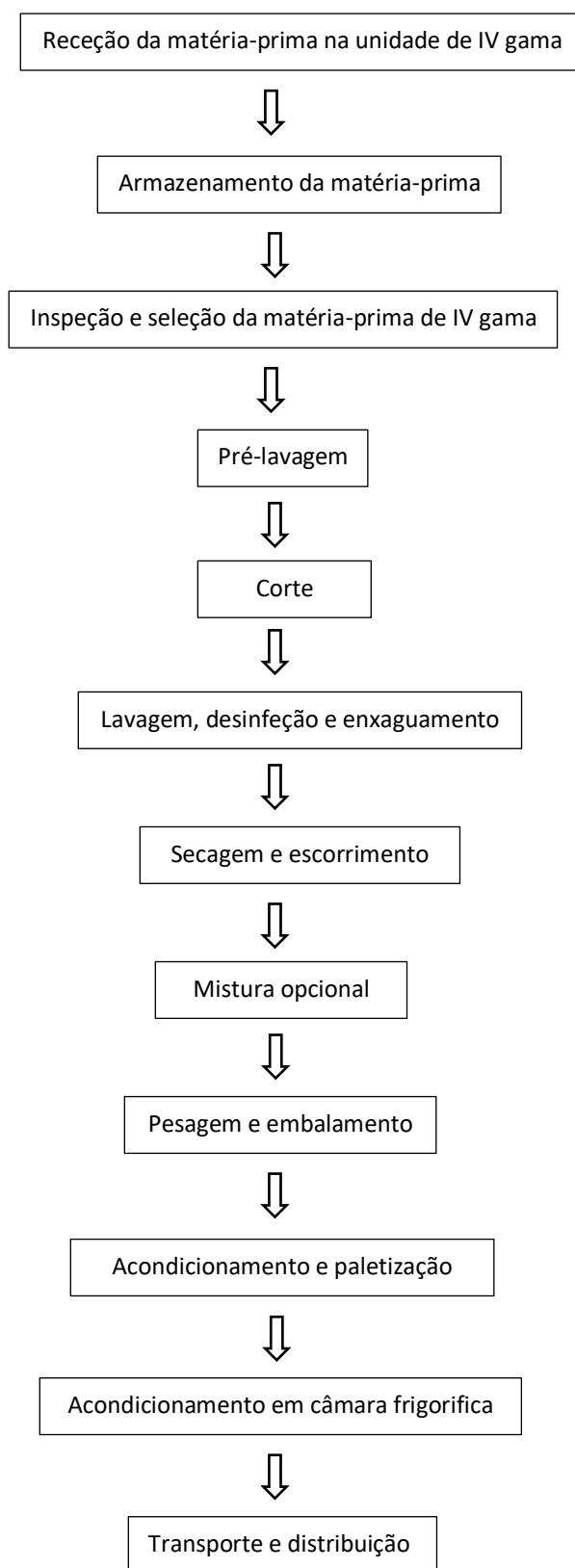


Figura 1 Etapas gerais do processamento mínimo de produtos hortofrutícolas (Adptado de Silva *et al.*,2011).

2.1.1 Receção da matéria-prima

De acordo com Cenci (2011) e Silva *et al.* (2011), após a colheita, os produtos são pré-refrigerados a temperaturas a cerca de 5°C. Posto isto, a matéria-prima é, inicialmente, transportada pelos produtores ou fornecedores até às instalações do estabelecimento para o processamento, enquanto isso, a restante matéria-prima que fica no produtor/fornecedor é armazenada em câmaras refrigeradas a 5°C e com 90% de humidade relativa. De seguida, ocorre a receção da matéria-prima (no caso daquela que tem como finalidade o processamento), onde a mesma é pesada e recebe uma etiqueta de identificação de acordo com os produtos, guia/lote de entrada, data de receção, quantidade recebida, entre outros. De acordo com Cenci *et al.* (2011), o tempo que decorre entre todas as etapas de processamento deve ser o menor possível de forma a garantir a qualidade do produto final.

Segundo o Codex Alimentarius (2013), Guiné (2012) e Silva *et al.* (2011), após a receção, a matéria-prima será submetida a uma inspeção de controlo de acordo com determinações físicas como é o caso da frescura, acondicionamento, calibre, forma, cor, textura, integridade, bem como, dos restantes aspetos gerais dos vegetais como, por exemplo, a rastreabilidade dos mesmos. Depois desta etapa é também realizado o controlo laboratorial, com determinações químicas e microbiológicas. Sendo que as determinações químicas passam por teor de sólidos solúveis, acidez total titulável, teor de açúcares, pH, clorofila total, polifenol oxidase (PFO), peroxidase (POD), fenilalanina amónia-liase (FAL), resíduos químicos. Por outro lado, as determinações microbiológicas passam pela segurança do produto, higiene do produto, adesão a boas práticas de fabrico e manutenção da qualidade do produto durante a vida útil.

Ainda de acordo com Silva *et al.* (2011), os processos, anteriormente, mencionados determinam, por vezes, que a matéria-prima não apresenta características desejáveis para o processamento, sendo a mesma rejeitada. Para evitar isto, e tendo sempre em vista a qualidade e a segurança alimentar são feitas visitas periódicas e é dada formação aos produtores para evitar, por exemplo, níveis residuais de pesticidas e elevada carga microbiana (aspetos que são controlados através do adequado manuseamento).

2.1.2 Armazenamento da matéria-prima

Conforme Vasconcelos (2005) e Silva *et al.* (2011), após a receção das matérias-primas, estas são armazenadas em câmaras frigoríficas a temperaturas compreendidas entre 1°C a 8°C, que variam consoante o tipo de hortícola, fruto ou tubérculo a conservar. Para além disso, o sistema de armazenamento nas câmaras é do tipo *first in, first out* (FIFO).

2.1.3 Preparação da matéria-prima na linha de processamento

De acordo com Vasconcelos (2005), a matéria-prima é encaminhada para as câmaras frigoríficas e é direcionada para a produção, mais especificamente para a sala de preparação, onde são realizadas, quando necessário, as seguintes tarefas: escolha/seleção; calibragem; pré-lavagem e/ou pré-desinfecção. Esta sala é climatizada a temperaturas compreendidas 5°C a 10°C para evitar diferenças de temperatura e uma maior degradação dos tecidos.

Segundo Silva *et al.* (2011), na escolha/seleção a matéria-prima é selecionada e preparada de maneira a obter uma maior uniformização do produto final, bem como, retirar todo o material vegetal estranho ou de qualidade deficiente. Os materiais a separar podem ser partes de vegetais deformados de outras culturas ou mesmo matérias não vegetais que possam estar presentes.

Segundo Martins e Empis (2000), segue-se a calibração que tem como função uniformizar calibres sempre que tal seja exigido por lei ou pela própria tecnologia. Esta operação, normalmente, é manual mas pode ser mecanizada, por exemplo, através de células fotoelétricas ou detectores de metais. A calibração pode ser através de separação volumétrica ou mássica e visa formar lotes de dimensões mais homogéneas. A calibração de base volumétrica é feita em calibradores que são, em geral, de três tipos: calibrador tubular; calibrador de crivos em pilha; calibrador de cabos divergentes. Opta-se por um ou outro tipo de calibrador em função da matéria-prima e da proporção de elementos finos na mistura. Deve-se ter sempre presente a vantagem do material fazer o menor percurso no crivo, de forma a minimizar danos mecânicos.

De acordo com Martins e Empis (2000), a pré-lavagem tem como objetivo retirar alguns detritos que possam vir aderentes aos vegetais. A lavagem vai ainda completar a escolha em alguns casos, já que implica a separação por diferença de densidades. É fundamental que toda a água utilizada nestas operações de lavagem seja sempre potável.

2.1.4 Corte

Segundo Silva *et al.* (2011) e Vasconcelos (2005), o corte é feito por equipamentos que utilizam sistemas de lâminas de corte diferenciados, em função do tamanho e espessura do produto, sendo realizado a alta velocidade para melhorar a precisão do corte e reduzir danos mecânicos no tecido do produto final. As hortaliças podem sofrer diversos tipos de cortes, originando diferentes formas de apresentação. Por exemplo, as alfaces podem ser comercializadas em fatias ou em folhas inteiras.

Ainda de acordo com Vasconcelos (2005), a redução de tamanho é estabelecida pelo tipo de aspeto pretendido para o produto final, todavia, a redução de dimensões consiste numa operação delicada, pois nesta etapa os produtos hortícolas podem sofrer danos elevados, o que favorece o aumento da atividade enzimática e microbiana. As operações como cortar ou fatiar, para além disso, reduzem o tempo de vida útil do produto, afetam o seu sabor, cor e textura e também promovem a libertação de nutrientes que estimulam o crescimento microbiano.

2.1.5 Lavagem, Desinfecção e Enxaguamento

Segundo Silva *et al.* (2011) e Vasconcelos (2005), após o corte, o material processado deve passar por um processo de desinfecção. A higienização abrange as fases de lavagem, desinfecção e enxaguamento de todos produtos que estão sujeitos ao processamento mínimo. Para as hortaliças a higienização é efetuada em duas etapas. Em primeiro lugar a lavagem é feita com água corrente e logo a seguir ocorre a imersão que é feita em solução com desinfetante indicado para os alimentos. Mas é importante salientar que a concentração de desinfetante, bem como, o tempo de contacto, variam em conformidade com a matéria-prima e com a recomendação do fabricante. Após a lavagem as hortaliças são enxaguadas para a remoção total do desinfetante.

Os desinfetantes recomendáveis para os produtos hortofrutícolas minimamente processados são o cloro, o dióxido de cloro, o hipoclorito de sódio, o peróxido de hidrogénio, o ácido peracético e o ozono (Silva *et al.*, 2011., Vasconcelos, 2005 e Sapers, 2003).

Segundo Gil *et al.* (2015) e Olmez e Kretzchmar (2009), o desinfetante que se destaca é o cloro, sendo usualmente utilizado pelas empresas do sector alimentar devido à sua eficácia, fácil utilização e baixo custo.

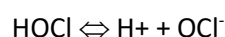
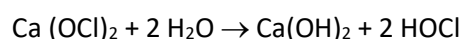
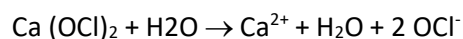
De acordo com Huang e Chen (2011), os ácidos lácticos, cítricos, acéticos e tartáricos têm sido descritos como fortes antimicrobianos atuando sobre microrganismos mesófilos e psicotrópicos em hortaliças. De entre os ácidos orgânicos mais utilizados estão o ácido acético, o láctico e o ascórbico. No Quadro 1 apresentam-se os agentes de desinfecção mais comuns na indústria alimentar e as respetivas concentrações por unidades.

Quadro 1 Desinfetantes utilizados no processamento mínimo de frutas e vegetais.

Agente desinfetante	Concentração (ppm)	Unidades
Cloro	50-200	ppm/mg/l
Ozono (O ₃)	0,1-2,5	ppm/mg/l
Dióxido de cloro (ClO ₂)	1-5	ppm/mg/l
Ácido peracético (CH ₃ CO ₃ H)	≤ 80	ppm/mg/l

Ppm = partes por milhão, ou o equivalente a mg/L Adaptado de Spers *et al.*, (2003)

Segundo Ayala-Zavala e González-Aguilar (2011) e Sapers (2003), o cloro pode ser utilizado na forma de gás (Cl₂), ou como líquido sob a forma de hipoclorito de sódio (NaOCl) ou de cálcio [Ca (OCl)₂]. De acordo com Shen *et al.* (2015), geralmente, o cloro é aplicado numa concentração entre 50 - 200 ppm e tem um tempo de atuação entre 1 e 2 minutos. Quando o cloro elementar e os hipocloritos são adicionados à água, ocorrem as seguintes reações:



De acordo com Simons (2001), o termo "cloro livre disponível" refere-se ao cloro elementar (Cl₂), ao ácido hipocloroso (HOCl) e aos iões hipoclorito (OCl⁻). A dissociação de HOCl depende do pH, e do equilíbrio entre o HOCl e OCl⁻, que é mantido, mesmo quando o HOCl é consumido constantemente através da sua atividade antimicrobiana.

Segundo Artés e Allende (2005), a atividade antimicrobiana do HOCl é atribuída ao cloro, que em combinação com as proteínas da membrana celular forma compostos N-clorados que, interferem com o metabolismo da célula. A inibição de enzimas sensíveis à oxidação pelo cloro parece, também, estar envolvida na morte de microrganismos. Esta atividade depende de vários fatores, entre eles o pH, a temperatura e o tempo de contacto com o produto a desinfetar.

De acordo com Ayala-Zavala e González-Aguilar (2011) e Simons (2001), para a desinfecção do cloro ser eficaz, o pH deve ser mantido entre 6,5 e 7,5. Acima deste, o OCl^- (forma inativa) é formado, não sendo eficaz para efeitos de desinfecção. O HOCl (forma ativa) permanece abaixo deste intervalo, muitíssimo eficaz na desinfecção, tal como é evidente na Figura 2.

No entanto, Gil *et al.* (2009) e Rico *et al.* (2007), indicam ser, extremamente, corrosivo para o equipamento e, pode ainda causar irritação nos pulmões e pele dos trabalhadores, descolorações nos produtos e levar à formação de subprodutos halogenados com características carcinogéneas.

Segundo Simons (2001), a acumulação de matéria orgânica e detritos na água de lavagem deve ser monitorizada, e a mesma deve ser substituída assim que seja necessário. Conforme Selma *et al.* (2008), a possibilidade da hipercloração na água de lavagem está associada ao alto volume de carbono orgânico que pode contribuir para o aumento da concentração de trihalometanos e de outros subprodutos na desinfecção (Selma *et al.*, 2008).

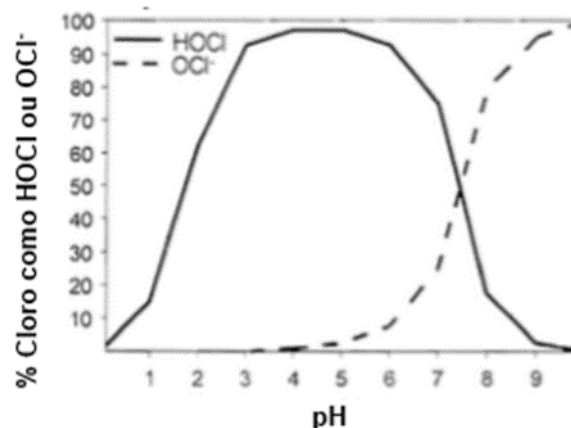


Figura 2 Percentagem de cloro livre disponível em solução em relação ao pH (Adaptado de Kitinoja e Gorny, 1999).

2.1.6 Secagem / escorrimento

Conforme Silva *et al.* (2011), após a lavagem, desinfecção e enxaguamento, os vegetais são conduzidos para o processo de secagem ou escorrimento onde é retirado o excesso de humidade do produto de forma a melhorar a sua apresentação e vida útil. Para além da redução da humidade no interior da embalagem, são ainda removidos resíduos de exsudado celular resultante do corte que promovem o crescimento de microrganismos patogénicos e deterioradores. O processo de secagem pode ser realizado em contínuo ou em descontínuo por centrifugação ou por túnel de secagem de ar filtrado, entre outras formas.

2.1.7 Mistura (opcional)

De acordo com Cenci (2011), antes do produto final ser pesado e embalado, podem ser feitas misturas em proporções previamente estabelecidas. No caso de se proceder à mistura de duas ou mais matérias-primas, esta deve ser feita de forma a que o produto final seja homogéneo. A operação de mistura é feita após a preparação individual de cada matéria-prima.

2.1.8 Pesagem e embalamento

Segundo Cenci (2011), após a secagem e antes de se proceder ao embalamento recomenda-se fazer uma segunda inspeção aos produtos, tendo como objetivo eliminar pedaços danificados, com problemas de aparência ou qualquer outro tipo de defeito.

Ainda de acordo com Cenci (2011) e Kitinoja e Gorny (1999), o primeiro passo para o embalamento de produtos minimamente processados é garantir a quantidade certa que será distribuída por cada embalagem. Esta operação pode ser realizada de forma manual ou utilizando equipamentos de embalagem automática, em que a pesagem é feita por esses mesmos equipamentos.

Segundo Cenci (2011), o processo de embalamento varia de acordo com o tipo de produto a embalar, as suas características fisiológicas, a expectativa de vida útil esperada do produto final, entre outros. Estes critérios são importantes na seleção da película de plástico a utilizar e a sua permeabilidade na utilização, ou não, de atmosfera modificada a vácuo.

De acordo com Kitinoja e Gorny (1999), como parte de uma boa prática de fabrico, o produto final deve ser examinado quanto à presença de metais estranho, fragmentos de facas ou parafusos pertencentes aos equipamentos sendo que são, tudo, fontes possíveis de contaminação por metais. Os detetores de metais devem ser devidamente calibrados para um funcionamento eficaz.

Conforme Cenci (2011), caso seja detetada a presença de algum metal, o tapete pára, dando um alerta luminoso ou acústico, ou rejeita a embalagem. As embalagens são rejeitadas pelo controlador de peso e são re-embaladas, no entanto, as embalagens rejeitadas pelo detetor de metais são entregues ao controlo de qualidade para o preenchimento do registo de não conformidades e posteriormente os vegetais seguem para refugo. Nesta fase, o produto acondicionado deve ser submetido a uma inspeção visual para assegurar a integridade da embalagem, para evitar a sua recontaminação. Na rotulagem

constam as seguintes informações, marca, identificação do fabricante, data de fabrico, especificação do produto, validade, condições de conservação (temperatura) peso líquido do produto e componentes utilizados.

2.1.9 Acondicionamento e paletização

Conforme Cenci (2011), o produto final, é devidamente embalado, e deve ser acondicionado em caixas de plástico ou em caixas de cartão. As primeiras deverão ser higienizadas e desinfetadas. Ainda de acordo com Kitinoja e Gorny (1999), as caixas devem ser pré-arrefecidas de modo a garantir que o produto não seja colocado em caixas quentes. De seguida, as caixas são colocadas em paletes para posterior armazenagem.

2.1.10 Armazenamento em câmara frigorífica

De acordo com Cenci (2011), os produtos acabados são armazenados em câmaras frigoríficas, a uma temperatura não superior a 5°C. Já segundo Almeida (2005), o produto é armazenado em câmaras frigoríficas a uma temperatura que varia de 1°C a 4°C. Por outro lado, no Regulamento (CE) nº 852/2004 de 29 de abril relativo à higiene dos géneros alimentícios a temperatura recomendada para este género alimentício (saldas minimamente processadas) compreende valores entre 0°C a 5°C.

Conforme Cenci (2011), as câmaras frigoríficas, onde serão armazenados os produtos finais, não podem ser as mesmas do armazenamento dos produtos frescos que provêm do campo, pois poderá ocorrer contaminação cruzada dos produtos processados acabados.

2.1.11 Transporte e distribuição

Conforme Chaim *et al.* (2006), por último, os produtos são transportados em camiões refrigerados, a uma temperatura máxima de 4°C, e distribuídos para posterior comercialização.

2.2 Epidemiologia e contaminação cruzada

De acordo com Cardamone *et al.* (2015), os surtos de doenças transmitidas por alimentos associados ao consumo de produtos frescos minimamente processados estão a aumentar simultaneamente com o aumento da frequência de consumo.

Conforme Gil *et al.* (2015), a presença de microrganismos patogénicos nestes produtos alerta para a necessidade de um maior controlo da produção desde o campo até à mesa dos consumidores.

De acordo com Food Safety Watch (2016) e Abadias *et al.* (2011), os principais problemas na pós-colheita que fazem com que os vegetais sejam altamente perecíveis são a facilidade de crescimento microbiano, os danos mecânicos, a elevada taxa de respiração, o amarelecimento, a podridão, a perda de água e os danos pelo frio. Infelizmente, tem sido demonstrado que os atuais tratamentos de lavagem e desinfeção industriais não garantem a eliminação total de agentes patogénicos quando presentes.

Segundo Food and Agriculture Organization (2010), as bactérias patogénicas são contaminantes de vegetais frescos. Quando estas estão presentes nos vegetais minimamente processados podem causar danos à saúde do consumidor (inclusive serem mortais), dependendo do nível de contaminação e da patogenicidade do agente.

Conforme Health Protection Agency (2009), as bactérias indicadoras podem estar associadas a um aumento da probabilidade da presença de agentes patogénicos, bem como, à possível fonte de contaminação, de origem fecal, e indica-nos se as condições sanitárias foram inadequadas durante o processamento. Os organismos indicadores são úteis na avaliação da segurança do produto alimentar porque tendem a estar presentes em números mais elevados do que a maioria dos agentes patogénicos e são relativamente rápidos e fáceis de identificar. Quando se encontram a níveis acima do limite do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 exigem uma investigação mais aprofundada.

2.3 Microrganismos que afetam a qualidade

Segundo Almeida (2005), a definição de qualidade é vista como um conjunto de atributos e características de um produto relacionadas com a sua capacidade de satisfazer necessidades intrínsecas ou exógenas. Segundo Veiga *et al.* (2012), nas hortícolas a qualidade está dividida em duas vertentes: as características intrínsecas que estão diretamente relacionadas com o produto (aspeto, frescura, tamanho, defeitos, forma, homogeneidade, cor, brilho, sabor, aroma, valor nutritivo, vitaminas, minerais, fibra, estado microbiológico, resíduos de pesticidas, produtos de limpeza e desinfeção) e as características exógenas, as quais nada têm a ver com o produto propriamente dito, mas sim com a apresentação, a identificação, a facilidade para consumir de imediato, a correspondência com uma determinada marca e a relação preço/qualidade. De um modo geral estas características estão regulamentadas por normas de comercialização como por exemplo: produtos isentos de defeitos, de humidades, de odores, de sabores estranhos, limpos, são e divididos pelo seu calibre.

De acordo com Barbosa (2003), a aceitabilidade de um produto é determinada pela conjugação dos atributos externos e internos. Os atributos de qualidade externos são imediatamente observados no produto, são facilmente identificados pela visão e pelo tato e são os que mais influenciam a decisão de compra.

Conforme Food and Agriculture Organization (2011), os atributos de qualidade internos são identificados quando o produto é cortado ou consumido. São estes atributos que determinam o seu consumo satisfatório, influenciando a decisão de repetir a compra do produto. Como já foi referido, os atributos internos englobam o odor e o sabor, onde a sua conjugação é denominada como *flavour*, sensações táteis na boca, como a suculência, a dureza e o farinhento, detetados pelo olfato, gosto e tato. Por fim, os atributos de qualidade ocultos, apesar de serem de difícil avaliação para o consumidor, a sua perceção contribui para a sua decisão de compra.

Para Barbosa (2003), a falta de qualidade e consequentemente a redução do tempo de vida útil do produto pode ser condicionada pelo tipo de produto e por diversas causas. Por exemplo nas hortaliças de folhas como a alface, espinafre e couves, as principais causas são a perda de água, o amarelecimento, danos mecânicos, a taxa de respiração elevada e podridões.

2.3.1 Contagem de Microrganismos a 30°C

De acordo com Food Safety Watch (2009) e Scientific Committee on Food (SCF) (2002), as contagens de microrganismos a 30°C, não contribuem diretamente para a avaliação da segurança de alimentos prontos-a-comer, eles são indicadores da qualidade e da validade dos vegetais prontos para consumo, uma vez que estes microrganismos são responsáveis pela sua deterioração. Segundo Food Safety Watch (2009), as contagens elevadas podem indicar problemas de qualidade e têm como possíveis causas, a refrigeração inadequada e um elevado período de exposição, a temperatura inadequada (abuso de tempo/ temperatura) ou falhas no processo de lavagem e desinfecção, entre outros.

De acordo com Murray-Brown Laboratories Inc. (2014), os microrganismos são inevitavelmente introduzidos durante o processamento (corte, embalagem, e outras manipulações), mas isso deve ser minimizado através das boas práticas de fabrico. O tipo de embalagem pode influenciar a taxa de crescimento microbiano, por exemplo a embalagem a vácuo irá retardar o crescimento de organismos aeróbios obrigatórios devido à exclusão de oxigénio. A temperatura de refrigeração para produtos estáveis também influencia a taxa de crescimento microbiano; o armazenamento abaixo de 8°C irá impedir o crescimento da maioria dos agentes patogénicos de origem alimentar - com as notáveis exceções de *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* -, mas não de organismos de deterioração tais como *Pseudomonas* psicotrópicas; uma temperatura de refrigeração mais baixa irá reduzir a taxa de crescimento adicional e ajuda a prolongar o tempo de vida em prateleira.

Conforme salientado por Food and Agriculture Organization (2016), quando o tempo de armazenamento aumenta o número de colónias aeróbias também aumenta; isto também ocorrerá se as temperaturas de refrigeração forem mal controladas ou se o alimento for frequentemente retirado da refrigeração. As contagens totais quando são inferiores a 10^6 ufc/g estão geralmente associadas a uma microbiota mista. Acima deste nível, há geralmente um organismo predominante, e a aceitabilidade e a qualidade organoléptica dos alimentos irão depender do tipo de organismo que predomina. Para alimentos crus, prontos a comer, tais como vegetais, as contagens totais são suscetíveis de serem muito mais elevadas, entre 10^6 e 10^8 ufc/g. Isto tenderá a limitar o seu período de vida e aplica-se aos produtos, comercializados prontos para o consumo, como saladas e outros vegetais crus.

2.3.2 Contagem de bolores e leveduras

Segundo Smith *et al.* (2004) e Hozová *et al.* (2002), o maior problema que limita o tempo de vida de prateleira de produtos com humidade elevada e intermédia é o crescimento de bolores. Muitos bolores são capazes de se desenvolverem a uma a_w superior a 0,8 enquanto alguns bolores xerofílicos (bolores que crescem a uma a_w inferior a 0,85) conseguem desenvolver-se a valores de a_w tão baixos como 0,65. Conforme Smith *et al.* (2004) e Marín *et al.* (2002), os produtos que passam por uma etapa em que são sujeitos a temperaturas elevadas, estão livres de bolores e esporos, no entanto, os produtos podem ficar contaminados, posteriormente, por esporos de bolores vindos do ar, de superfícies, de equipamento e ainda pelos manipuladores de alimentos. De acordo com Spencer Gutiérrez *et al.* (2009) e Spencer (2001), os bolores causam alterações no sabor e no odor do produto, podendo em alguns casos produzir ainda micotoxinas.

Para Jay *et al.* (2005) e Hajdenwurcel (1998), as leveduras podem crescer numa vasta gama de pH ácido pH <4,5, nos quais a sua presença elevada é indicativa de falhas ao longo do processamento, comprometendo a vida útil do produto. Segundo Smith *et al.* (2004) e Spencer (2001), a deterioração por leveduras ocorre, principalmente, em produtos minimamente processados nomeadamente em “vegetais folhosos” com humidade intermédia e alta. A contaminação destes produtos resulta, normalmente, de utensílios e equipamento inadequadamente higienizado. Deste modo, ao manter as boas práticas de fabrico, a contaminação por estes microrganismos será minimizada.

2.3.3 Contagem de *Pseudomonas* spp.

Segundo Ochoa *et al.* (2013), o género *Pseudomonas* spp. é composto por bactérias em forma de bacilo, aeróbias móveis e Gram negativas. “Oportunistas” e ubíquas podendo ser isoladas do solo, da água, das plantas e dos animais. São microrganismos altamente versáteis, tolerantes a condições de baixo oxigénio e nutrientes que crescem em faixas de temperatura de 4° a 42°C.

Segundo Abdul-Mutalib *et al.* (2019) e Ferreira e Sousa *et al.* (2000), na indústria alimentar, a importância das *Pseudomonas* está relacionada com a deterioração e encurtamento da vida útil de alguns alimentos tais como leite processado, vegetais crus, produtos de pastelaria e sumos não pasteurizados, podendo originar maus odores, viscosidade e mau sabor. Sabe-se, por isso, que a espécie *Pseudomona fluorescens* encontra-se envolvida na

alteração da cor, sabor e aroma de alimentos refrigerados (alface embalada) porque cresce a 4°C.

De acordo com Cantwell (2002), o crescimento microbiano nos produtos minimamente processados é controlado, principalmente, com higienização adequada e temperaturas, devidamente, controladas ao longo de toda a cadeia produtiva. A higienização dos equipamentos e o uso de água tratada com cloro consistem em procedimentos padrão. A temperatura baixa durante e após o processamento, geralmente, retrata o crescimento microbiano, mas pode selecionar o meio para o crescimento de organismos psicrótrófos, como *Pseudomonas*. Além disso, o excesso de humidade aumenta o crescimento microbiano, tornando a remoção da água de lavagem e da higienização um ponto crítico do processo.

2.4 Perigos biológicos que afetam a segurança

A norma ISO 22000:2018 define segurança alimentar como “A capacidade de fornecer produtos seguros em conformidade com requisitos legais e regulamentares, bem como os dos clientes, relacionados com a segurança alimentar; ou que resultem em produtos seguros, para o consumidor quando usados segundo a utilização prevista, em conformidade com requisitos legais e regulamentares, bem como os dos clientes, relacionados com a segurança alimentar”.

De acordo com Afonso (2008), Linhares (2005) e Baptista e Venâncio (2003), a contaminação biológica é o processo de introdução e adaptação de espécies que não fazem naturalmente parte de um alimento, possuindo a maioria delas uma grande capacidade de ajuste às condições e limitações do meio, podendo provocar alterações no mesmo, sendo esta a principal razão para a frequente degradação dos alimentos. Por estas razões, é bastante preocupante que a contaminação apresente um risco mais elevado para a segurança dos consumidores, podendo a sua introdução ser intencional ou acidental, por via de humanos ou não.

Segundo Afonso (2008), Baptista e Linhares (2005), Baptista e Venâncio (2003) e Untermann (1998), estima-se que cerca de 90% das doenças de origem alimentar sejam provocadas por perigos biológicos e neles incluem-se as bactérias (principais responsáveis por toxinfecções alimentares) e fungos, microrganismos capazes de se desenvolverem nos alimentos quando reunidas as condições adequadas. Para além destes, incluem-se, igualmente, parasitas,

vírus, príons, organismos que não são capazes de se desenvolverem nos alimentos. Os microrganismos fazem parte de uma flora presente na maioria dos alimentos. Contudo, a contaminação aqui retratada, que representa um perigo significativo para segurança dos géneros alimentícios, é sobretudo resultante da má manipulação e do somatório de erros no âmbito da aplicação das boas práticas de higiene, quer por parte do manipulador, quer da qualidade das matérias-primas ou do envolvente, entre outras possíveis fontes de contaminação. No Quadro 2 são resumidas as etapas mais críticas associadas ao perigo de contaminação.

Quadro 2 Pontos críticos associados a perigos biológicos.

Etapas	Perigo
Produção	Presença de parasitas, pesticidas, resíduos de antibióticos, pedras, terra e objetos pessoais
Armazenamento após a receção	Contaminação microbiana por contacto crescimento da carga microbiana (temperaturas elevadas)
Corte	Contaminação microbiana por contacto
Lavagem e desinfeção	Contagem microbiana excessiva
Centrifugação	Aumento da temperatura do produto. Desenvolvimento da carga microbiana
Pesagem	Recontaminação microbiana
Embalamento	Desenvolvimento microbiano (temperaturas elevadas, embalagem danificada ou mal fechada)
Armazenamento, expedição e transporte	Más condições de conservação (temperaturas elevadas)

Adaptado de Moldão e Empis (2000)

Conforme Almeida (2005), as hortaliças são geralmente produtos são, pouco propícios ao desenvolvimento de patogénicos humanos, sendo por isso responsáveis por uma reduzida percentagem de intoxicações alimentares declaradas. Em grande parte dos casos, o desenvolvimento de podridões conduz ao fim da vida pós-colheita e os produtos alterados não são geralmente consumidos. No entanto, as oportunidades para a contaminação dos produtos hortofrutícolas com patogénicos humanos durante o seu manuseamento são abundantes. No Quadro 3 referem-se as bactérias patogénicas que já foram associadas a intoxicações ou infeções devido ao consumo de frutas ou hortaliças.

Quadro 3 Bactérias patogénicas associados a hortofrutícolas.

		Bactéria patogénica
Toxico-infeções	Intoxicações (provocadas por toxinas)	<i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringens</i>
	Infeções (provocadas por bactérias)	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Shigella</i> spp. <i>Vibrio cholerae</i> ; <i>Yersinia enterocolitica</i>

Adaptado de Almeida (2005)

De acordo com Almeida (2005), as hortaliças podem ser contaminadas com vírus através da água ou por pessoas infetadas. A principal virose transmitida por hortaliças é a hepatite A. A dose infecciosa para a maioria dos vírus é muito pequena; podem bastar 10 partículas virais para provocar uma infeção. A prevenção da contaminação é essencial para prevenir o risco provocado pelos vírus. Os organismos patogénicos podem estar presentes no alimento sem que haja intoxicação alimentar. Normalmente é necessário que ocorra multiplicação celular, o que exige condições propícias. A ocorrência de uma intoxicação depende da carga microbiana patogénica ingerida, da idade da pessoa (crianças e idosos são mais suscetíveis) e do estado fisiológico (imunodeprimidos são mais sensíveis). Os sintomas clínicos mais frequentes incluem diarreia, vómitos, dores abdominais e febre. A redução dos riscos biológicos associados ao consumo de frutas e hortaliças frescas necessita de uma abordagem integrada entre o campo e a mesa. As infeções podem ser prevenidas ou reduzidas através das seguintes estratégias:

- prevenir a contaminação; é necessário dar especial atenção a: água, compostos e corretivos orgânicos, saúde e higiene dos trabalhadores;
- controlar o crescimento dos patogénicos; manter a cadeia de frio;
- remover ou matar os patogénicos.

Os corretivos orgânicos são produtos naturais, sem aditivos químicos que promovem um efeito positivo no crescimento e produtividade das culturas, incrementando as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, como a retenção da água, o arejamento e o aumento e diversificação da atividade microbiológica do solo.

A eficácia da desinfecção de produtos hortofrutícolas é frequentemente limitada. A cutícula hidrofóbica, a morfologia da superfície, abrasões e ferimentos na superfície das hortaliças

protegem os patogénicos, de forma que estes não contactam com os desinfetantes. Outras vezes, os patogénicos encontram-se fisicamente ligados através de biofilmes ou infiltram-se através de estruturas superficiais, tais como estomas (estruturas constituídas por um conjunto de células localizadas especialmente na epiderme inferior das folhas) lenticelas, cicatrizes, danos mecânicos nos tecidos.

2.5 Microrganismos que afetam a segurança alimentar nos produtos minimamente processados

2.5.1 *Enterobacteriaceae*

De acordo com Anderson e Pascual (2000), e Pandey *et al.* (2000) e Mossel e Garcia (1985), a família das *Enterobacteriaceae* é constituída por bactérias Gram-negativas em forma de bastonetes, móveis ou não, que podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas, sem capacidade para produzir esporos, mas que fermentam a glucose e reduzem os nitratos a nitritos. A esta família pertencem, entre outros, os géneros *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Edwardsiella* spp., *Hafnia* spp., *Proteus* spp., *Yersinia* spp., *Morganella* spp., *Erwinia* spp., *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. e *Klebsiella* spp.

Pandey *et al.* (2000) e Varnam e Sutherland (1995), indicaram que algumas das espécies pertencentes a esta família de microrganismos têm importância como agentes potencialmente patogénicos e outras como saprófitas que contribuem para a deterioração de alguns alimentos, mas o principal interesse da sua determinação reside no facto de constituírem um adequado índice de segurança para os alimentos processados.

Segundo Health Protection Agency (2009) e Gil *et al.* (2009), os altos níveis destas bactérias podem ocorrer em alguns produtos alimentares, tais como hortaliças. O uso de desinfetantes pode reduzir, mas não eliminar totalmente estes organismos.

A European Food Safety Authority (EFSA) (2014), recomendou a monitorização e a realização de testes relativamente às *Enterobacteriaceae* tanto nas zonas de fabrico como no produto acabado. Por conseguinte, a família *Enterobacteriaceae* pode ser utilizada na monitorização de rotina e, caso estes microrganismos estejam presentes, podem efetuar-se testes para deteção de agentes patogénicos específicos [(Regulamento (CE) n.º 2073, 2005)]. No caso das saladas de vegetais crus, a sua quantificação é importante na avaliação da qualidade das mesmas, uma vez que é um bom indicador de segurança alimentar na preparação de saladas.

2.5.2 *Salmonella* spp.

De acordo com Lampel *et al.* (2012), as bactérias do género *Samonella* spp. são microrganismos Gram–negativos, na sua maioria móveis, não são formadoras de endósporos, pertencem à família *Enterobacteriaceae* e apresentam uma forma de bastonete. A *Salmonella* spp. está bastante difundida na natureza e pode invadir o trato intestinal de vertebrados, envolvendo, animais selvagens, animais domésticos e seres humanos.

Segundo Viegas (2009), os sintomas da infeção por *Salmonella* spp. são principalmente vómitos, náuseas, diarreia aquosa, febre persistente, cólicas abdominais, dor de cabeça e sonolência. Nas pessoas com o sistema imunológico comprometido, a *Salmonella* spp. pode dispersar-se para outros órgãos e causar doenças graves como anomalia cardíaca, anomalia circulatória e infeção intracraniana. A transmissão deste agente patogénico pode ocorrer através do contacto direto com animais infetados, por meio de material fecal contaminado ou também pelo contacto com água contaminada.

De acordo com Lampel *et al.* (2012) e Viegas (2009), a *Salmonella* spp. pode ter uma grande diversidade de produtos alimentícios de origem animal ou vegetal como fonte de infeção. Os surtos têm sido associados à ingestão de alimentos contaminados como água contaminada, saladas e vegetais. Nos últimos anos, a nível internacional, os vegetais têm sido considerados como veículo de salmonelose, muito devido à utilização de resíduos animais como fertilizantes e de águas contaminadas, como as águas de irrigação.

2.5.3 *Escherichia coli*

Segundo Lampel *et al.* (2012) e Viegas (2009), a *Escherichia coli* é um coliforme fecal. Assim sendo, é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa que apresenta forma de bastonete. A *E. coli* é um microrganismo predominante no intestino de seres humanos e de outros mamíferos, pelo que a sua presença em água e em alimentos aponta logo para uma contaminação fecal e possível presença de patogénicos entéricos. A maioria das estirpes de *E. coli* são inofensivas e proporcionam benefícios para a saúde do hospedeiro, podendo prevenir a colonização do intestino por microrganismos prejudiciais.

De acordo com Viegas (2009), algumas estirpes desta espécie podem ocasionar infeções alimentares graves em humanos. As estirpes patogénicas de *E. coli* podem classificar-se como:

- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC): principais causadoras de diarreia em crianças em países menos desenvolvidos e de diarreia nos viajantes de países com boas condições sanitárias que viajam para países com condições de higiene precárias; as doenças provocadas por estas estirpes são usualmente diarreia aquosa com cólicas abdominais, mal-estar, vómitos e febre;
- *E. coli* enteropatogénica (EPEC): causa diarreia em crianças até aos três anos de idade nos países em desenvolvimento, geralmente, estas estirpes provocam diarreia aquosa acompanhada de febre e vómitos;
- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC): é a responsável por doenças mais críticas em humanos; estirpes produtoras de verotoxina, sendo que as infeções em seres humanos estão mais frequentemente associadas ao serotipo O157:H7. Os casos humanos, geralmente, são esporádicos e os sintomas têm a duração de um a sete dias e, normalmente, consistem em diarreia aquosa ou hemorrágica e, casualmente, em vómitos. Todavia estas infeções podem resultar num quadro de síndrome urémico hemolítica (SUH) ou *Uremic Haemolytic Syndrome* que é caracterizado por insuficiência renal aguda, anemia e trombocitopenia, sendo a infeção com o serotipo O157:H7 considerada a maior causa de insuficiência renal em crianças;
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC): infeta a mucosa do cólon, reproduz-se no interior dos enterócitos propagando-se para as células adjacentes e levando, posteriormente, à destruição das células infetadas; os sintomas caracterizam-se por diarreia, inicialmente,

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM

aguda e aquosa que progride para fezes sanguinolentas e mucoides, com cólicas abdominais e febre;

- *E. coli* enteroagregativa (EAEC): cuja terminologia é devido ao seu padrão típico de ligação às células tecidulares formando agregados de grande dimensão, podendo causar tanto diarreia aguda como persistente.

De acordo com Viegas (2009), as estirpes patogénicas de *E. coli* são, usualmente, transmitidas por meio de alimentos ou água contaminada com material fecal. Os alimentos que têm sido frequentemente envolvidos em surtos são principalmente vegetais frescos e produtos minimamente processados como, por exemplo, a alface.

2.5.4 *Listeria monocytogenes*

Conforme Bubert *et al.* (1997), a *Listeria monocytogenes* é uma bactéria que se apresenta em forma de bastonete, Gram-positiva-positiva, anaeróbio facultativa, possuidora de catalase, mas não contém citocromo C (teste da oxidase negativo).

Segundo Fang *et al.* (2013), é um microrganismo psicrotrófico capaz de crescer a temperaturas de refrigeração e em locais onde as condições atmosféricas são frias e húmidas. Produz ácido, mas não produz gás a partir de alguns hidratos de carbono (Ferreira e Sousa, 2000).

De acordo com Penteado e Leitão (2004), os animais doentes ou portadores podem estar na origem das estirpes de *Listeria* patogénicas para os seres humanos. A bactéria tolera teores elevados de sal, pH ácido e desidratação. Para além disso, pode crescer numa variada gama de temperaturas.

Fang *et al.* (2013), indicaram que este microrganismo não representa um perigo para todas as pessoas, apenas para alguns grupos mais frágeis, como é o caso dos recém-nascidos, grávidas, idosos, doentes crónicos e indivíduos com o sistema imunológico enfraquecido. A listeriose neonatal é a mais comum, sendo que a bactéria ingerida pela mãe afeta o feto e pode ser adquirida através da ingestão de alimentos contaminados, no caso dos alimentos prontos a consumir, entre eles produtos lácteos e cárneos, bem como, algumas frutas e vegetais. A doença tardia ocorre 2 a 3 semanas após o parto e pode manifestar-se como uma meningite (Churchill e Lee e Hall 2006; Ferreira e Sousa 2000).

De acordo EFSA (2018), os casos de listeriose diminuíram ligeiramente em 2017: foram reportadas 2480 infeções, contra as 2509 de 2016. Contudo, a tendência foi de subida nos últimos cinco anos. O grupo mais afetado pela doença em 2017 foi o dos idosos, em particular, com mais de 84 anos. Nesta faixa etária, a taxa de mortalidade por listeriose foi de 24%. Em geral, na UE, a infeção foi fatal para um em cada 10 pacientes. Os níveis mais altos de *L. monocytogenes* foram detetados no peixe e nos produtos de pesca 6%, seguidos das saladas prontas a consumir 4,2%.

Segundo Jofré *et al.* (2005), a dose de infeção da listeriose não é conhecida, pois depende da estirpe e da suscetibilidade do indivíduo. A International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) refere que 100 ufc/g de *L. monocytogenes* em alimentos no momento de consumo é aceitável e não se torna um risco. Na União Europeia é

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM

obrigatório, para alimentos prontos a comer, uma ausência de *L. monocytogenes* em 25 g (Kotzekidou, 2013).

Segundo o Regulamento (CE) n.º 1441/2007, para alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os que são destinados a lactentes e a fins medicinais, o seu limite pode ser 100 ufc/g, e é aplicado a produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil, ou deve estar ausente em 25 g, o que se aplica antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu.

2.5.5 *Shigella* spp.

Segundo Araújo (1997), a *Shigella* é uma bactéria Gram-negativa, que apresenta a morfologia de um bacilo. A sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C. Esta bactéria (*Shigella*) está pouco distribuída pelo ambiente, não havendo conhecimento de reservatórios animais, à exceção do homem. É eliminada pelas fezes do indivíduo portador ou do indivíduo infetado durante o período de convalescença. A contaminação pode acontecer através das fezes, diretamente através das mãos ou, com maior frequência, indiretamente através dos alimentos ou água contaminada por matérias fecais ou tendo os insetos como vetores intermédios.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2009) e Araújo (1997), a *Shigella* é um género de bactéria considerada, a nível mundial, como uma das principais causas de diarreia e disenteria (diarreia com sangue e muco nas fezes). O organismo, *Shigella* pode invadir e destruir as células de revestimento do intestino grosso, provocando ulceração da mucosa e diarreia sanguinolenta. Os sintomas incluem ainda febre e dores abdominais. Os sintomas surgem entre 1 e 4 dias após a ingestão de alimentos contaminados. A dose infecciosa é baixa, estima-se que menos de 100 microrganismos são suficientes para provocar a infeção. A *Shigella* apresenta uma temperatura ótima de crescimento de 37°C, sendo destruída pelo calor (a pasteurização é suficiente para destruir a bactéria). As infeções provocadas por *Shigella dysenteria* são as mais severas, embora qualquer pessoa seja suscetível de contrair shigelose, visto que o homem é o hospedeiro natural deste microrganismo. Na verdade, os sintomas são mais severos em idosos, em crianças e em indivíduos imunodeprimidos. Esta infeção é muito frequente nos indivíduos portadores de HIV sendo que a transmissão entre indivíduos possível pela via fecal-oral.

De acordo com Jay (2005), os principais alimentos envolvidos são qualquer alimento contaminado, principalmente, saladas minimamente processadas, mariscos e água.

2.5.6 *Yersinia enterocolitica*

De acordo com Hajmeer e Fung (2006) e Jay (2000), a *Yersinia enterocolitica* é um bacilo Gram-negativo. Esta bactéria tem uma temperatura ótima de crescimento entre os 25°C e os 37°C. Os tratamentos térmicos como a esterilização, entre outros (existe ainda a pasteurização e a ultrapasteurização, por exemplo, mas não são aplicáveis neste segmento), são, normalmente, utilizados na confeção de alimentos e suficientes para destruir a bactéria.

Segundo Food and Drug Administration (2009) e McMahon e Wilson (2001), a *Yersinia enterocolitica* é um microrganismo de distribuição ubiqüitária, sendo isolado em animais, alimentos e água. Este agente pode ser encontrado na água salgada, e também nas águas residuais. Os veículos de contaminação alimentar podem ser peixe, marisco, carne, e também vegetais.

Segundo Food and Drug Administration (2009), a *Yersinia enterocolitica* foi associada a dois tipos de infeção, uma com características semelhantes à cólera, que provoca diarreia aquosa e outra que provoca disenteria. Nos doentes imunocomprometidos, o agente pode causar uma infeção generalizada. No grupo infantil é frequente causar uma doença gastrointestinal. Este agente é um indicador de contaminação ambiental.

2.6 Mecanismos de contaminação

Conforme consta no ponto III, do Anexo II, do capítulo IX, do Regulamento (CE) nº852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de (2004), relativo à higiene dos géneros alimentícios em todas as fases da produção, transformação e distribuição, os alimentos devem ser protegidos de qualquer contaminação que os possa tornar impróprios para consumo humano, perigosos para a saúde ou contaminados de tal forma que não seja razoável esperar que sejam consumidos nesse estado.

De acordo com Matos (2014), o crescimento microbiano num dado alimento de origem vegetal ou animal é afetado por um determinado número de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos estão relacionados com o próprio alimento, ou seja, ligados à atividade da água (a_w), à acidez do alimento (pH), ao potencial de oxidação-redução (Eh), à composição química, à presença de potenciais substâncias antimicrobianas naturais e à estrutura biológica do alimento. Já os fatores extrínsecos relacionam-se com as condições de armazenamento, nomeadamente, com a temperatura, a humidade relativa e a atmosfera envolvente, assim como do grau de manipulação/processamento do alimento.

No Regulamento (CE) n.º 852/2004, a produção de géneros alimentícios implica uma visão integrada desde a produção primária até ao consumidor final, “do prado ao prato”, onde os produtos hortofrutícolas não são exceção.

De acordo com o mesmo regulamento os produtos de origem vegetal podem ser contaminados de diversas formas por microrganismos patogénicos ou de deterioração. A contaminação, geralmente, inicia-se na fase de produção, nos campos, no contacto com o solo, água, fezes de animais, insetos e pelos próprios manipuladores. Contudo, a contaminação pode continuar durante as etapas de colheita, transporte, processamento ou de preparação e termina na preparação do produto pelo consumidor.

De acordo com Bean *et al.* (1997), o número de surtos de infeção alimentar documentados e associados ao consumo de produtos frescos de origem vegetal aumentou, justificando-se, portanto, a adoção de medidas que invertam esta tendência.

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM

Segundo Framegas (2012), o desenvolvimento de microrganismos em vegetais vai depender das suas características, propriedades do vegetal e dos efeitos da preparação, embalagem e armazenamento. Cada produto ao ser preparado passa por uma série de etapas, incluindo manipulação, lavagem, contacto com os equipamentos e conservação. Cada uma dessas etapas pode interferir na contaminação, proliferação e sobrevivência dos microrganismos. Segundo análises efetuadas em etapas distintas na preparação das hortaliças comprovou-se que o produto final é menos contaminado do que as hortaliças no início do processamento.

No entanto, de acordo com Beulens *et al.* (2005), e King *et al.* (1991), citados por Framegas (2012), a contaminação microbiana pode também ocorrer durante o processamento e distribuição, devendo por isso, serem cumpridas as boas práticas de higiene em todas as etapas de produção, ou seja, desde a receção das matérias-primas até à distribuição. A contaminação durante todo o processo produtivo pode ocorrer devido a falhas de higiene pessoal, temperatura incorreta, ar, equipamentos/ utensílios de produção mal higienizados, contaminação cruzada com outros alimentos, matérias-primas contaminadas, erros de produção entre outros.

De acordo com King *et al.* (1991), citados por Framegas (2012), os utensílios utilizados na preparação podem ser potenciais fontes de contaminação do vegetal, pois, normalmente, possuem partes de difícil higienização onde as bactérias se alojam, bem como, superfícies irregulares, que permitem a infiltração microbiana, fornecendo condições para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos.

De acordo com os mesmos autores, a conservação da matéria-prima ou do produto final, mal-acondicionadas e/ou a temperaturas incorretas, favorece a contaminação e, conseqüentemente, a proliferação microbiana, podendo mesmo atingir níveis de contaminação inaceitáveis, do ponto de vista da segurança do produto.

2.7 Mecanismos de prevenção

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 852/2004, embora, a segurança alimentar seja um componente da qualidade, a garantia da segurança e a garantia da qualidade são frequentemente efetuadas por programas distintos, embora, complementares. Para essa segurança ser alcançada, algumas ferramentas de gestão são adotadas na cadeia de produção de alimentos. Na produção de hortofrutícolas, têm-se recomendado as Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Fabrico (BPF) e Higiene (BPH) e o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP) (EFSA, 2011^b). Segundo a alínea 2, do ponto II, da Parte A, do Anexo I, do Regulamento (CE) n.º 852/2004, os operadores das empresas do sector alimentar devem assegurar, tanto quanto possível, que os produtos da produção primária sejam protegidos de contaminações, atendendo a qualquer transformação que esses produtos sofram posteriormente.

De acordo com Tiago (2010), Bastos (2006) e Almeida (2005), as BPA são um conjunto de normas e orientações, que visam auxiliar os agricultores, para atingir o padrão de qualidade da matéria-prima. As BPF e BPH são um conjunto de princípios e regras para um correto manuseamento de alimentos, abrangendo desde as matérias-primas até ao produto final, de forma a garantir a segurança e a integridade do consumidor. As BPF e BPH foram desenvolvidas por governos, pelo Comité de Higiene de Alimentos do *Codex Alimentarius* (FAO/WHO) e por indústrias alimentares, muitas vezes em colaboração com grupos de inspeção e controlo.

Segundo Vaz *et al.* (2010) e Baptista *et al.* (2003), o sistema HACCP é um sistema que tem como objetivo garantir a segurança dos alimentos através da identificação dos perigos associados ao seu manuseamento e das medidas adequadas ao seu controlo. Deve assim ser encarado como uma ferramenta de análise e prevenção de perigos ligados ao processamento alimentar e não para o controlo apenas do produto final. Este sistema de autocontrolo pode ser aplicado ao longo de toda a cadeia alimentar, desde a produção primária até ao consumidor final, e a sua implementação deve ser orientada pelas evidências científicas dos perigos para a saúde pública.

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM

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

Para que estas recomendações sejam postas em prática corretamente, é importante que todos os manipuladores recebam formação básica sobre essas mesmas práticas, tal como foi mencionado no ponto 1, do Capítulo XII, do Anexo II, do mesmo regulamento.

2.8 Métodos de referência vs. métodos alternativos

2.8.1 Métodos de referência

De acordo com Montville e Mathews (2008), os métodos de referência para a análise microbiológica dos alimentos envolvem diversas etapas exigentes. Além disso, são métodos com custos elevados, não só em consumíveis como em ocupação do equipamento, mas também ao nível do tempo gasto pelo preparador/analista, na sua execução e na preparação de meios de cultura. Os produtos minimamente processados possuem uma vida de prateleira curta, limitando a utilização destes métodos na sua análise. Uma vez que a obtenção de resultados demora alguns dias e o tempo do produto na prateleira fica limitado. De modo a facilitar e a acelerar algumas etapas de análise através dos métodos de referência, surgiram diversas ferramentas laboratoriais automatizadas. Por exemplo, uma boa homogeneização da mistura da amostra com um diluente ou meio de cultura líquido, pode ser obtida através de um homogeneizador peristáltico (Stomacher®) e as restantes diluições podem ser realizadas por um dispensador automático (*diluter*). A sementeira em placas pode também ser realizada utilizando sistemas automatizados que distribuem o inoculo para placas sobre uma plataforma rotativa (*spiral plater*).

Segundo Doyle e Beuchat (2007), a identificação do microrganismo desconhecido é efetuada com base nas suas características bioquímicas. Esta identificação é um processo longo e dispendioso existindo, atualmente, diversos *kits* que permitem uma identificação mais rápida e económica dos patogénicos (como, por exemplo, o sistema de identificação API®, *bioMérieux*). No entanto, estes *kits* revelam-se métodos enfadonhos quando é necessário identificar um grande número de colónias.

2.8.2 Métodos alternativos

Segundo Doyle e Beuchat (2007), o desenvolvimento de novos métodos, mais rápidos do que os métodos de referência, tem estado em constante crescimento e tem acompanhado, paralelamente, a incidência de surtos de doenças de origem alimentar. Por exemplo, são cada vez mais comuns os ensaios para a deteção de *Listeria*, *Salmonella* e *Campylobacter*, importantes microrganismos patogénicos de grande impacto ao nível da saúde pública.

Estes métodos alternativos, que evidenciam maior rapidez, simplicidade e facilidade de execução, podem ser classificados em quatro grupos diferentes com base na sua tecnologia: métodos físicos, químicos, moleculares e imunológicos (Jay, 2006).

2.8.2.1 Métodos físicos

Segundo Jay (2006), os métodos físicos baseiam-se na contagem do número de células presentes numa amostra. A contagem pode ser realizada através de um contador eletrónico (*COULTER counter*), que tem por base a avaliação da resistência das células presentes. Outros exemplos de métodos físicos são a microcalorimetria, a impedância/condutância (*Bactometer, bioMérieux*) e a citometria de fluxo.

2.8.2.2 Métodos químicos

De acordo com Doyle e Beuchat (2007), os grandes avanços conseguidos no desenvolvimento de métodos dentro deste grupo centram-se na utilização de substratos cromogénicos e fluorogénicos e na utilização de ATP (adenosina-trifosfato). Recentemente os meios cromogénicos têm sido introduzidos na identificação de microrganismos patogénicos, nomeadamente, de *Listeria* spp. (ALOA) e *Salmonella* spp. (SM ID2, *bioMérieux*).

Segundo *bioMérieux* (2009), os meios cromogénicos possuem substratos na sua composição que permitem a revelação de atividades enzimáticas correspondentes a determinados microrganismos através do aparecimento de uma coloração no meio.

De acordo com os mesmos autores, a técnica de bioluminescência é de particular importância uma vez que não requer um enriquecimento da cultura e fornece uma rápida estimativa da qualidade dos alimentos e das superfícies analisadas. Esta técnica utiliza a enzima luciferase para medir a presença de ATP presente em todas as células vivas (sistema de bioluminescência de raios *Hi-Lyte*). No entanto, a utilização deste tipo de técnicas oferece resultados indiretos na presença das populações microbianas, estando mais vocacionados para o controlo da eficácia de higienização.

2.8.2.3 Métodos moleculares

Os métodos moleculares baseiam-se na informação genética das células [ácido desoxirribonucleico – ADN] para diferenciação e identificação dos microrganismos patogénicos. Incluem, entre outros, os métodos de reação em cadeia de polimerase (*PCR*), eletroforese em gel de campo pulsado e ribotipagem (Doyle e Beuchat, 2007).

O *PCR* é talvez o método mais aplicado. Baseia-se na utilização de enzimas para amplificar um segmento específico do DNA e constitui um método altamente sensível que consegue amplificar, em poucas horas, 10^6 vezes o segmento de DNA. Existem atualmente algumas alternativas ao *PCR* convencional, como por exemplo o *PCR* em tempo real, com mais vantagens de aplicação à análise microbiológica de alimentos (Montville e Mathews, 2008; Doyle e Beuchat, 2007).

2.8.2.4 Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos são, de entre todos os métodos alternativos, os mais utilizados para a avaliação da inocuidade dos alimentos. Os métodos imunológicos permitem a identificação de bactérias patogénicas específicas, associadas a uma grande variedade de matrizes alimentares. Estes métodos baseiam-se na formação de um complexo antigénio-anticorpo e distinguem-se cinco técnicas diferentes baseados nesta reação (Doyle e Beuchat, 2007): aglutinação de látex ou *latex agglutination* (LA); aglutinação passiva reversa de látex ou *reverse passive latex agglutination* (RPLA); imunodifusão de gel; separação imunomagnética; imunoprecipitação; e ensaio de imunoabsorção enzimática ou *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).

Segundo Doyle e Beuchat (2007), a técnica, de utilização de esferas de látex revestidas com anticorpos formam uma reação de aglutinação visível na presença de um antigénio específico do microrganismo alvo. A aglutinação passiva ou reversa de látex difere da aglutinação em látex, pois a primeira utiliza a adsorção de anticorpos ou antigénios solúveis ou polissacarídeos na superfície de micropartículas inertes (suportes) que não interferem na interação antigénio-anticorpo enquanto, que a aglutinação em látex (partículas de látex são esferas de poliestireno utilizadas como suporte na adsorção) é empregue na pesquisa de antígeno (Ag) ou anticorpo (Ac).

Segundo Doyle e Beuchat (2007), a técnica de imunodifusão de gel consiste num ensaio que é apenas utilizado no teste *Salmonella*, um dos primeiros métodos rápidos na análise

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM

microbiológica dos alimentos. É baseado na imunodifusão (deslocação das proteínas através do agar) e na formação do complexo antígeno-anticorpo que forma um precipitado visível numa câmara. Os anticorpos são específicos para *Salmonella* flagelar e, portanto, não deteta as variantes não flagelares.

De acordo com Doyle e Beuchat (2007), a técnica de separação imunomagnética foi concebida para separar o microrganismo alvo da amostra. Os anticorpos estão acoplados a esferas magnéticas que, quando adicionadas à amostra, facilitam a adesão das células alvo isolando o complexo. As esferas podem ser depois inoculadas em meio líquido, ser colocadas em meio sólido seletivo ou ser diretamente utilizadas em PCR.

Conforme Doyle e Beuchat (2007), a técnica de imunoprecipitação e deteção dos antígenos é realizada através de esferas coloridas de látex revestidas com os anticorpos, também conhecido como imunocromatografia.

Segundo Doyle e Beuchat (2007), os testes ELISA baseiam-se na formação de um complexo (*sandwich*) constituído por anticorpo-antígeno-conjugado. A deteção dos antígenos presentes numa cultura de enriquecimento é feita através de anticorpos revestidos numa matriz sólida e através da adição de um segundo anticorpo que se encontra conjugado com uma enzima. Um substrato é depois adicionado e é alterado pela enzima produzindo um produto colorido que pode ser lido visualmente ou através de um espectrofotómetro. Existem diversas variações do formato ELISA que incluem modificações ao nível do sinal.

2.9 Kits rápidos Hygicult®

De acordo com alguns autores, como Salo *et al.* (2002), o Hygicult® é um método destinado à análise semi-quantitativa, de modo, a identificar e a controlar a presença de microrganismos em superfícies que possam provocar malefícios para a saúde pública. Esta gama inclui placas que são revestidas em ambos os lados com meios de cultura específicos, presentes num tubo assético de fácil transporte para o local de monitorização. Para além disso, a mesma é inoculada por contacto com a superfície, com a zaragatoa ou por imersão. O uso de Hygicult® apresenta inúmeras vantagens, tais como:

- não afeta a superfície e/ou o produto analisado;
- fácil de utilizar, manusear e interpretar, sendo que permite uma interpretação acessível dos resultados após a inoculação;
- possibilita a realização de dois testes num só *dipslide*;
- é ainda um método exato e de confiança.

Para Salo (2000), torna-se importante frisar que o Higycult®, também conhecido como *dipslide*, é constituído por um plástico articulado, envolvido por slides que se encontram cobertos, em ambos os lados, pelo meio de cultura de agar. Já o slide, propriamente dito, encontra-se num frasco estéril, sendo que quando é feita a amostragem e/ou a inoculação o mesmo (*slide*) é diretamente pressionado sobre a superfície de trabalho.

2.10 Métodos de pesquisa e contagem de microrganismos

2.10.1 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

O procedimento de referência para a deteção e quantificação de *Listeria monocytogenes*, em produtos destinados ao consumo humano e animal, encontra-se descrito na ISO 11290-1:1996 (incluindo a sua atualização ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004) e ISO 112902:1998, respetivamente.

A deteção de *L. monocytogenes* através do método de referência é um procedimento que requer duas etapas de enriquecimento (primário e secundário) seguidas do isolamento em dois meios sólidos seletivos diferentes que permitem a visualização das colónias Agar *Listeria according to Ottaviani and Agosti* (ALOA) e *Palcam e/ou Oxford*.

As colónias presuntivas de *L. monocytogenes* são sujeitas a uma série de testes bioquímicos para a sua identificação (ISO 11290-1:1996, ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004).

2.10.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

O procedimento de referência para a deteção de *Salmonella* spp. em produtos destinados ao consumo humano e animal, encontra-se descrito na ISO 6579:2002.

A deteção de *Salmonella* spp. de acordo com o referido procedimento, envolve um pré-enriquecimento não seletivo para a revitalização das bactérias do género *Salmonella* (presentes em pequeno número e/ou fragilizadas pelos processos de produção e armazenamento).

Após o pré-enriquecimento é efetuado um enriquecimento seletivo em dois meios de cultura líquidos para favorecer o crescimento das *Salmonellas* presentes (*Rappaport-Vassiliadis medium with soya - RVS* e *Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin broth – MKTTn*). É depois realizada uma cultura em dois meios sólidos seletivos (*Xylose Lysine deoxycholate agar – XLD* e por exemplo, *Brilliant green agar – BGA* ou *chromIDtm Salmonella - SM2*) que permitem a visualização das colónias. As colónias presuntivas de *Salmonella* são depois sujeitas a testes bioquímicos e sorológicos para a sua identificação (ICMSF, 2000; ISO 6579:2002).

2.10.3 Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras é realizada de acordo com a ISO 21527-2:2008 em que foi utilizado o meio *Cooke Rose Bengal (CRB)* para bolores e leveduras halotolerantes e incubação a 25°C durante 5 dias. A expressão dos resultados efetua-se em ufc/g ou em log de ufc/g.

As colónias de bolores apresentam micélio, o que as permite distinguir das colónias de leveduras. Estas apresentam colónias pequenas, lisas ou rugosas, de cor uniformes, opacas ou brilhantes. A contagem microbiológica expressa-se em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g).

2.10.4 Contagem de *Escherichia coli*

A contagem de *E. coli*, é realizada de acordo a ISO 16649-2:2001. De acordo com esta ISO, o método de contagem é por incorporação em placa de Petri de 1 ml de cada diluição decimal em meio de cultura *TBX (Biokar, França)*. As placas são incubadas à temperatura de 44 ± 1°C durante 21 ± 3h. O resultado é obtido diretamente pela contagem das colónias características, nomeadamente, as de cor azul. A contagem microbiológica expressa-se em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g).

2.10.5 Contagem de microrganismos a 30°C

A contagem de microrganismos aeróbios a 30°C está descrita na NP 4405 (2002). De acordo com a norma, efetuam-se sementeiras por incorporação de alíquotas de 1 mL das diluições, em meio de cultura *PCA* (*Plate Count Agar*, Merck), efetuado as contagens das colónias formadas após a incubação a 30 (±1) °C durante 48 e 72 horas (Microbiological Incubator, series BD53, Binder, VWR).

A contagem microbiológica expressa-se em unidade formadoras de colónias por grama (ufc/g), com a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/g} = \Sigma c \div [V \times (n1 + 0,1 n2) \times d]$$

Σc – Soma das colónias em todas as placas contadas

V – Volume de inóculo semeado em cada placa

n1 – Número de placas da primeira diluição contada

n2 – Número de placas da segunda diluição contada

d – Diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens

2.10.6 Contagem de *Enterobacteriaceae*

A contagem da *Enterobacteriaceae* está descrita na ISO 21528-2:2004. De acordo com esta ISO, o método de contagem é por incorporação em placa de Petri de 1 ml de cada diluição decimal em meio *VRBG* (*Biokar*, França). As placas de Petri são incubadas à temperatura de 37 ± 1°C durante 24h. Faz-se a contagem das colónias características com coloração rosa a vermelha, com ou sem halo de precipitação de sais biliars. Os resultados são expressos em ufc/g.

2.10.7 Pesquisa e contagem de *Pseudomonas* spp.

O meio de cultura utilizado na pesquisa de *Pseudomonas* spp. foi o *Pseudomonas Agar Base* (Oxoid, SR0103E) (Oxoid Limited, 2010). A contagem das *Pseudomonas* spp. está descrita na ISO 16266:2006. De acordo com esta ISO, o meio utilizado para a quantificação do microrganismo em estudo foi o CM0559 *Pseudomonas Agar Base da Oxoid*. O período de incubação das sementeiras é de 24 horas a 30°C.

As colónias apresentam cor amarela com pigmentação verde. O meio usa sais de magnésio e potássio para promover a formação de pocianina, o que facilita a visualização das colónias (Lab M Limited, 2006).

CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Introdução

Para a realização do presente estudo foram feitas análises numa unidade de processamento de vegetais, em Portugal, no mês de novembro de 2019. Para isso, foi analisado um único produto alimentar, nomeadamente, a rúcula quer a granel quer embalada e em três superfícies numa das linhas de processamento, mais concretamente, o primeiro tapete de lavagem, a terceira linha do vibrador, o tapete elevador de embalagem e ainda o secador de folhas. Para a avaliação nestes locais, na matéria-prima e no produto embalado optou-se por utilizar o método alternativo Hygicult®, através da técnica de sementeira por contacto direto e em simultâneo o método convencional através da técnica de zaragatoa, técnica de colheita de água no centrifugador de folhas, técnica de recolha do produto a granel e na técnica de recolha do produto embalado, tal como é possível verificar no Quadro 4, que se segue.

Quadro 4 Descrição das técnicas utilizadas no estudo.

	Técnica	Descrição da técnica
Método alternativo Hygicult®	Técnica de sementeira por contacto direto	Foram utilizadas placas de contato, contendo um meio de cultura que entra em contato com a superfície a analisar “tipo carimbo”, para onde os microrganismos presentes foram transferidos diretamente para o meio de cultura. De seguida fecharam-se as placas, foi feita a incubação e, por fim, foi efetuada a contagem das unidades formadoras de colónias (FAO, 2002; Salo, 2000).
	Técnica de zaragatoa	Esfregou-se a extremidade da zaragatoa na superfície a analisar para depois a zaragatoa ser colocada num tubo com água estéril ou solução de diluição. Posteriormente, foram realizadas culturas da amostra em vários meios de cultura e de crescimento de modo a identificar o tipo de microrganismo presente. Por fim, após a incubação, foi efetuada a contagem das unidades formadoras de colónias (ufc’s) existentes nas placas (Lelieveld <i>et al.</i> , 2005; FAO, 2002; Moore <i>et al.</i> 2002).
Método convencional	Técnica de colheita de água no centrífugador de folhas	Nesta técnica foi utilizado um frasco estéril para fazer a colheita da análise dos parâmetros microbiológicos de modo a garantir as condições de assepsia. Ocupou-se o frasco com cerca de três quartos do seu volume. Garantiu-se que o frasco estéril estava aberto pelo período estritamente necessário para a colheita da amostra. Já o bucal do frasco e a tampa não entraram em contacto com outras superfícies e a tampa foi mantida virada para baixo. A amostra foi protegida de correntes de ar e de salpicos.
	Técnica de recolha da matéria-prima a granel	Nesta técnica as amostras foram colhidas em diversos pontos do lote, constituído por 5 subamostras, com o mínimo de 100g cada, tendo em conta o Regulamento (CE) nº 1441/2007; NP – 1828 (1982), define as condições gerais a que deve obedecer a colheita de amostras dos géneros alimentícios para análises microbiológicas, onde cada subamostra deve ser individualizada.
	Técnica de recolha do produto embalado	Nesta técnica foi selecionado um exemplar de cada lote e as embalagens foram abertas.

3.2 Contaminação das superfícies

3.2.1 Colheita de amostras para análises convencionais e análises com *kits Hygicult*[®]

As amostras foram colhidas nos seguintes locais, na zona de alto risco (depois no tanque de desinfecção até à embalagem) e, em cada ponto de amostragem, conforme se verifica no Quadro 5:

- 1^o Tapete de lavagem da linha 3 (2 amostras);
- vibrador da linha 3 (2 amostras);
- tapete elevador de embalagem da linha 4 (1 amostras).

Os procedimentos de amostragem e processamento de zaraças utilizando métodos de análise convencional foram efetuados de acordo com a norma ISO 18593:2018.

Quadro 5 Avaliação de contaminação de superfícies – distribuição/ordem de amostras em cada ponto.

<i>Kit Hygicult</i> [®] Y&F		<i>Kit Hygicult</i> [®] TPC		Análise convencional	<i>Kit Hygicult</i> [®] E/ β -Gur		<i>Kit Hygicult</i> [®] E	
Face 1	Face 2	Face 1	Face 2		Face E	Face β -Gur	Face 1	Face 2

3.2.2 Transporte das amostras para análises convencionais e análises com *kits Hygicult*[®]

As amostras foram, provenientes de uma empresa a cerca de 250 km de Santarém.

As zaraças foram mantidas em caixas com isolamento térmico, em câmara frigorífica a cerca de 4°C, e, posteriormente, transportadas até a um laboratório exterior, a uma temperatura máxima, aproximada, de 5°C.

Os *kits Hygicult*[®] foram transportados até à Escola superior Agrária de Santarém, em mala térmica da marca CAMPINGAZ, modelo Powerbox Plus, a uma temperatura máxima controlada com cerca de 5°C.

3.2.3 Análises convencionais

No Quadro 6 podem-se observar as descrições dos parâmetros e os respetivos métodos utilizados para a avaliação da contaminação das superfícies.

Quadro 6 Parâmetros e métodos utilizados para análise em superfícies.

Parâmetros	Métodos
Contagem de microrganismos totais a 30°C	ISO 16649-2:2001
Contagem de bolores e leveduras	ISO 21527-1:2008
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	Rapid' <i>Enterobacteriaceae</i> AFNOR BRD:07/24- 11/13
Contagem de <i>C. Perfringens</i>	ISO 7937:2004
Contagem <i>E. Coli</i>	ISSO 16649-2:2001
Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	Compass <i>Listeria</i> Agar-AFNOR BKR 23/2-11/02; ponto 9 e 10 da ISO 18593:2018
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	ISO 18593:2018 pt.9 e 10 Rapid <i>Salmonella</i> AFNOR BRD 07/11-12/05

No Quadro 7 são apresentados os critérios usados na avaliação da contaminação de superfícies por microrganismos a 30°C e por microrganismos indicadores de higiene.

Quadro 7 Limites e critérios usados para avaliação da contaminação por microrganismos a 30°C e microrganismos indicadores de higiene (INSA, 2019) em ufc/100 cm² e em ufc/cm².

ufc/100 cm ²		
Microrganismos a 30 °C		
*Zona 2**	Satisfatório (ufc/100 cm ²)	≤10 ⁴
	Não satisfatório (ufc/100 cm ²)	>10 ⁴
<i>Enterobacteriaceae</i>		
*Zona 2**	Satisfatório (ufc/100 cm ²)	<10 ²
	Não satisfatório (ufc/100 cm ²)	>10 ²
<i>E. coli</i>		
*Zona 2**	Satisfatório (ufc/100 cm ²)	<10
	Não satisfatório (ufc/100 cm ²)	>10
ufc/cm ²		
Microrganismos a 30°C		
*Zona 2**	Satisfatório (ufc/100 cm ²)	≤100
	Não satisfatório (ufc/100 cm ²)	>100
<i>Enterobacteriaceae</i>		
*Zona 2**	Satisfatório (ufc/100 cm ²)	<1
	Não satisfatório (ufc/100 cm ²)	>1
<i>E. coli</i>		
*Zona 2**	Satisfatório (ufc/100 cm ²)	<0,1
	Não satisfatório (ufc/100 cm ²)	>0,1

*Quadro 10 (INSA,2019): zonas no ambiente de preparação/ distribuição alimentar (p.17).

** INSA (2019): superfícies em contacto direto com os alimentos durante os processos de preparação, confeção ou distribuição.

Também foram utilizados na análise dos resultados:

- Cinar e Onbasi (2021), que consideraram como objetivo uma contaminação < 10 ufc/cm², para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, *E.coli*,

coliformes e *Listeria spp.*, com base na Decisão da Comissão de 8 de Junho de 2001 que estabelece as regras para os controlos regulares à higiene geral efetuados pelos operadores aos estabelecimentos de acordo com a Diretiva 64/433/CEE relativa às condições de produção e de colocação de carnes frescas no mercado e com a Diretiva 71/118/CEE relativa a problemas sanitários em matéria de comércio de carnes frescas de aves de capoeira, em que são indicados níveis microbianos aceitáveis entre 0 a 10 ufc/cm², em equipamentos e superfícies de preparação de alimentos na área de produção;

- Snyder (1995), citado por Forsythe e Hayes (2002), considerou como boa contaminação entre 2-10 ufc/cm², na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos.

3.2.4 Superfícies- análises com kits Hygicult®

Alguns microrganismos têm um crescimento lento, por isso, é importante ter em consideração o binómio tempo-temperatura; quando o tempo de incubação é superior a um dia é recomendado registar igualmente os resultados do 1º dia – e todos os dias até ao fim do período de incubação -, pois as bactérias crescem abundantemente e, geralmente, são mais fáceis de ver depois de um dia de incubação; e alguns microrganismos de crescimento lento podem não ser visíveis depois de um dia de incubação;

Os testes rápidos, que foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante, foram os seguintes:

– o Hygicult® E, com agar adequado para as contagens de *Enterobacteriaceae*. Os *dipslides* foram pressionados, firmemente, durante 3-4 s contra a superfície testada e incubados a 35 ± 2°C durante 24-48h;

– o Hygicult® CF, adequado para a deteção de bactérias coliformes; os *dipslides* foram pressionados, firmemente, durante 3-4 s contra a superfície testada e incubados a 35 ± 2°C durante 24-48h;

– as *Enterobacteriaceae* e as espécies produtoras da enzima *β-glucuronidase* foram amostradas de maneira semelhante usando lâminas de contato Hygicult® E/β-Gur; um lado (E) da lâmina promove o crescimento de *Enterobacteriaceae*; o outro lado (β-Gur) é utilizado para testar a presença de organismos positivos para *β-glucuronidase* (isto é, *E. coli*); os *dipslides* foram pressionados, firmemente, durante 3-4 s contra a superfície testada e incubados a 35 ± 2°C durante 24-48h;

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM

- o Hygicult® TPC, com agar-agar adequado para contagens totais de microrganismos; os *dipslides* foram pressionados, firmemente, durante 3-4 s contra a superfície testada e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24h, $27 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 48h e $18-25^\circ\text{C}$ durante 5 dias;
- o Hygicult® Y&F, adequado para contagens de leveduras e bolores; os *dipslides* foram pressionados, firmemente, durante 3-4 s contra a superfície testada e incubados a $27 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 3-5 dias.

Ambos os lados das lâminas foram analisados com a finalidade de fazer a contagem de unidades formadoras de colónia, para além disso, os resultados da utilização dos *kits* foram interpretados de acordo com as instruções do fabricante, conforme está apresentado no Quadro 8.

Quadro 8 Limites e critérios para detetar microrganismos totais, coliformes, *Enterobacteriaceae*, e as espécies produtoras da enzima β - *glucuronidase* através da utilização das diversas gamas de Hygicult® nas superfícies de processamento de alimentos, utilizados por Lehto *et al.* (2011).

Referência	Grupo microbiano	Bom	Moderado	Inaceitável	Referências
Hygicult® TPC	Bactérias aeróbias totais	< 2 ufc/cm ²	2-10 ufc/cm ²	> 10 ufc/cm ²	Rahkio <i>et al.</i> (2006)
Hygicult® Y&F	Leveduras	< 1 ufc/cm ²	1-5 ufc/cm ²	> 5 ufc/cm ²	Hakala (2001)
Hygicult® Y&F	Bolores	-/+ (light)	++ (moderate)	+++ (heavy)	Instructions Orion Diagnóstica (2006)
Hygicult® E/ β -Gur	<i>Enterobacteriaceae</i>	< 0,1 ufc/cm ²	0,1-1,1 ufc/cm ²	> 1,1 ufc/cm ²	Instructions Orion Diagnóstica (2006)
	Bactérias positivas para β-glucuronidase	< 0,1 ufc/cm ²	0,1-1,1 ufc/cm ²	> 1,1 ufc/cm ²	Instructions Orion Diagnóstica (2006)
Hygicult® CF	Coliformes*	< 0,1 ufc/cm ²	0,1-1,0 ufc/cm ²	> 1,0 ufc/cm ²	*
Hygicult® E	<i>Enterobacteriaceae</i>	< 0,1 ufc/cm ²	0,1-1,1 ufc/cm ²	> 1,1 ufc/cm ²	Instructions Orion Diagnóstica (2006)

*Coliformes – por não haver referências, a não ser as do fabricante, que estavam expressas em (g/lado), foram adotados os critérios de (Hakala, 2001; Instructions Orion Diagnóstica (2006), Instructions Orion Diagnóstica (2011) & Rahkio *et al.* (2006) e foram convertidas de g/lado para ufc cm²/lado.

3.3 Avaliação da contaminação do produto acabado e da matéria-prima

3.3.1 Colheita das amostras do produto acabado e da matéria-prima

Para o ensaio as amostras foram recolhidas em diferentes pontos na linha de produção: antes da desinfeção; após a desinfeção; acabada (embalada). A colheita das amostras para a análise microbiológica foi efetuada em cada local de colheita em triplicado em sacos da marca Nasc, modelo Whirl-pak com uma capacidade de 384 ml e dimensões de 13 x 19 cm, cada um com cerca de 100g de amostra, sendo que foram três embalagens do produto final de cada.

No Quadro 9 estão apresentados os parâmetros e os métodos que foram na análise do produto acabado.

Quadro 9 Parâmetros e métodos que foram analisados do produto acabado.

Parâmetros	Métodos
Contagem de microrganismos totais a 30°C	ISO 4833-1:2013
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	Rapid' <i>Enterobacteriaceae</i> AFNOR BRD:07/24- 11/13
Contagem de <i>E. Coli</i>	ISO 16649-2: 2001
Contagem de <i>Clostrídios</i> sulfito-redutores	ISO 15213:2003
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	Rapid <i>Salmonella</i> AFNOR BRD 07/11-12/05
Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	Compass <i>Listeria</i> Agar AFNOR (BKR:23/2-11/02)

No Quadro 10 estão listados os limites e os critérios estabelecidos para os microrganismos a 30°C, *E. Coli*, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, colhidos na área de preparação alimentar.

Quadro 10 Limites e critérios usados para a avaliação da contaminação por microrganismos indicadores de higiene e segurança na matéria-prima.

Microrganismos a 30°C		
INSA (2019) *	Satisfatório (log/g)	< 6
	Questionável (log/g)	6-≤ 8
	Não satisfatório (log/g)	> 8
<i>E.coli</i>		
INSA (2019) *	Satisfatório (log/g)	< 1
	Questionável (log/g)	1-≤ 2
	Não satisfatório (log/g)	> 2
<i>Enterobacteriaceae</i>		
INSA (2019) *	Satisfatório (log 10/g)	< 5
	Questionável (log 10/g)	5-≤ 6
	Não satisfatório (log 10/g)	> 6
<i>Salmonella</i> spp.		
Ministerio de Salud de la República del Perú**	Mínimo (g)	Ausência/ 25 g
	Máximo (g)	-----
<i>L. monocytogenes</i>		
Ministerio de Salud de la República del Perú**	Mínimo (g)	Ausência/ 25 g
	Máximo (g)	-----

Quadro 10 (INSA, 2019): grupos e subgrupos de alimentos prontos para o consumo (p.15); *INSA (2019): grupo 3 - frutos e produtos hortícolas crus (p.16); ** norma sanitária que estabelece os critérios microbiológicos de qualidade sanitária e inocuidade para os alimentos e bebidas de consumo humano, RM nº 591,2008 (Ministerio de Salud de la Republica del Perú, 2008).

3.3.2 Contaminação da água do secador

Para avaliar a contaminação microbiana da água (uma amostra) resultante da secagem das folhas de rúcula, a água foi colhida com recurso a um recipiente estéril à saída do equipamento/turbina de sucção de ar e água, no tapete (perfurado) de condução das folhas à entrada da zona de alto risco, depois da desinfeção, numa zona do mesmo onde ocorre a secagem das folhas por passagem/sucção de ar em sentido descendente.

No Quadro 11 abaixo pode-se observar a descrição dos parâmetros que foram analisados e o respetivo método utilizado.

Quadro 11 Parâmetros analisados e o respetivo método utilizado de análise.

Parâmetros	Métodos
Contagem de microrganismos viáveis a 22 ± 2°C	ISO 6222:1999
Contagem de Coliformes	MEH 10.02
Contagem de <i>E. Coli</i>	MEH 10.02
Contagem de <i>C. perfringens</i>	ISO 14189:2013
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	ISO 19250:2010
Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	Compass <i>Listeria</i> Agar AFNOR BKR 23/2-11/02;

3.4 Valor do pH da água do tanque de desinfeção

O pH determinou-se na água do tanque de desinfeção, com a água a uma temperatura de cerca de 6,5°C. Efetuaram-se seis medições, com um potenciómetro digital da marca Mettler-Toledo, modelo FiveGo Portable F2 (Greifensee, Suíça), calibrado inicialmente com as soluções padrão de pH 4,00 (ref. 51350006) da marca Mettler-Toledo e o eletrodo da mesma marca, modelo LE438-IP67.

O valor de pH alvo para o melhor funcionamento do desinfetante (ácido cítrico) situa-se entre 2-8 (Premier, 2013).



CAPÍTULO IV – RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Contaminação das superfícies

4.1.1 Análises convencionais

No Quadro 12 podem observar-se os resultados obtidos relativamente à contaminação das superfícies dos equipamentos nas linhas de processamento 3 e 4.

Quadro 12 Resultados obtidos pela análise de superfícies dos equipamentos nas linhas de processamento 3 e 4.

Zonas de amostragem	Ponto	Contagem de microrganismos a 30 °C (ufc/cm ²)	Apreciação*	Contagem de bolores e leveduras (ufc/cm ²)	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> e (ufc/cm ²)	Apreciação*	Contagem de <i>C. perfringens</i> (ufc/cm ²)	Contagem de <i>E. coli</i> (ufc/cm ²)	Apreciação*	Pesquisa de <i>L.monocytogenes</i>
1º Tapete lavagem da linha 3	1	3,5 x 10 ¹	S	< 5	< 5	A	< 5	< 5	S	Ausente
	2	< 5	S	< 5	< 5	A	< 5	< 5	S	Ausente
Vibrador da linha 3	1	2,0 x 10 ¹	S	< 5	< 5	A	< 5	< 5	S	Ausente
	2	< 5	S	< 5	< 5	A	< 5	< 5	S	Ausente
Tapete elevador embalagem linha 4	1	< 5	S	< 5	< 5	A	< 5	< 5	S	Ausente

* INSA (2019); *Decisão da comissão de 8 de junho de 2001; A- Aceitável; S- Satisfatório.

Todos os resultados relativos às superfícies analisadas, mantiveram-se abaixo do valor máximo admissível, com resultados considerados “Satisfatórios” de acordo com INSA (2019).

4.1.2 Análises com kits Hygicult®

A seguir passam a apresentar-se os resultados referentes aos diferentes *kits*.

4.1.2.1 Hygicult®- TPC Microrganismos totais a 30°C

Os resultados das análises microbiológicas feitos com o *kit* TPC são apresentados no Quadro 13.

Quadro 13 Resultados de análise de superfície utilizando o *kit* Hygicult® TPC.

Zonas de amostragem	Amostra	24h (35± 2°C)	48h (27± 3°C)	5 dias (18-25°C)
1º Tapete de lavagem da linha 3	1ª	Moderado (3 ufc/cm ²)	Moderado (4 ufc/cm ²)	Moderado (3 ufc/cm ²)
	2ª	Moderado (2 ufc/cm ²)	Bom (1 ufc/cm ²)	Inaceitável (20 ufc/cm ²)
Vibrador da linha 3	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (1 ufc/cm ²)	Bom (1 ufc/cm ²)
	2ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)	Inaceitável (45 ufc/cm ²)
Tapete elevador embalagem da linha 4	1ª	Bom (1 ufc/cm ²)	Bom (1 ufc/cm ²)	Moderado (2 ufc/cm ²)

Utilizando este *kit* só se verificaram resultados inaceitáveis ao fim de 5 dias de incubação, na 2ª amostra do 1º tapete lavagem da linha 3 e na 2ª amostra do Vibrador da linha 3. Os restantes resultados corresponderam a uma classificação de Bom, exceto no 1º tapete de lavagem da linha 3, nos três períodos de incubação e no tapete elevador da embalagem da linha 4 ao fim de 5 dias de incubação, classificados como Moderados.

Ao fim de 24 horas, a maior contaminação verificou-se nas amostras do 1º tapete de lavagem da linha 3, com um resultado classificado como Moderado. Não houve contaminação nas outras duas superfícies.

Ao fim de 48 horas de incubação todos os resultados tiveram uma classificação de Bom exceto na 1ª amostra do 1º tapete de lavagem da linha 3, classificado como Moderado.

Ao fim 5 dias de incubação, no 1º tapete da lavagem e no Vibrador da linha 3, as primeiras amostras e a única amostra do tapete elevador da embalagem da linha 4 apresentaram uma classificação de Moderado, enquanto as segundas amostras das duas primeiras superfícies foram consideradas Inaceitáveis.

Dos resultados obtidos com a utilização do Hygicult®- TPC pode-se concluir que as contaminações foram mais elevadas no 1º tapete da lavagem e no Vibrador da linha 3, que se situa na “zona suja” antes da desinfecção, e, por isso, a contaminação nesta superfície é

mais elevada o que não permite que a higienização consiga eliminar microrganismos até ao nível eliminado nas outras superfícies (na “zona limpa” ou “de alto risco”), com uma menor contaminação antes da higienização.

4.1.2.2 Hygicult® CF – Coliformes

Os resultados das análises microbiológicas feitos com o *kit* CF são apresentados no Quadro 14.

Quadro 14 Resultados de análise de superfície utilizando o *kit* Hygicult® CF.

Zonas de amostragem	Amostra	24h (35± 2°C)	48h (27± 3°C)
1º Tapete de lavagem da linha 3	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
	2ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
Vibrador da linha 3	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Moderado (1 ufc/cm ²)
	2ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
Tapete elevador embalagem da linha 4	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)

Ao fim de 24 horas de incubação os resultados, utilizando este *kit*, alcançaram uma classificação de Bom todos com 0 ufc/cm², o mesmo verificou-se ao fim de 48 h de incubação, exceto no vibrador da linha 3, cuja 1ª amostra do Vibrador da linha 3 o resultado foi classificado como Moderado.

4.1.2.3 Hygicult® E- *Enterobacteriaceae*

Os resultados das análises microbiológicas feitos com o *kit* E são apresentados no Quadro 15.

Quadro 15 Resultados de análise de superfície utilizando o *kit* Hygicult® E.

Zonas de amostragem	Amostra	24h (35± 2°C)	48h (27± 3°C)
1º Tapete de lavagem da linha 3	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
	2ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
Vibrador da linha 3	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
	2ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
Tapete elevador de embalagem da linha 4	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)

Utilizando o *kit* Hygicult® E-*Enterobacteriaceae* não foi detetada nenhuma contaminação em nenhuma das superfícies.

4.1.2.4 Hygicult® Eβ -GUR- *Enterobacteriaceae* – Espécies produtoras da enzima β-glucuronidase

Os resultados das análises microbiológicas feitos com o *kit* Eβ -GUR são apresentados no Quadro 16.

Quadro 16 Resultados de análise de superfície utilizando o *kit* Hygicult® Eβ -GUR.

Referência	Zonas de amostragens	Amostra	24h (35± 2°C)	48h (27± 3°C)
<i>Enterobacteriaceae</i>	1º Tapete de lavagem da linha 3	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Moderado (1 ufc/cm ²)
		2ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
	Vibrador da linha 3	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
		2ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
	Tapete elevador de embalagem da linha 4	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
	<i>Enterobacteriaceae</i> - Espécies produtoras da enzima β-glucuronidase	1º Tapete de lavagem da linha 3	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)
2ª			Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
Vibrador da linha 3		1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
		2ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
Tapete elevador de embalagem da linha 4		1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)

Em ambos os períodos de incubação, o pior resultado foi no período de 48 horas, nomeadamente, no 1º tapete de lavagem da linha 3 na 1ª amostra, com um resultado classificado como Moderado.

4.1.2.5 Hygicult® Y&F- Leveduras e bolores

Os resultados das análises microbiológicas feitos com o *kit* Y&F são apresentados no Quadro 17.

Quadro 17 Resultados de análise de superfície utilizando o *kit* Hygicult® Y&F.

Zonas de amostragem	Amostra	3 dias (27± 3°C)		5 dias (27± 3°C)	
		Leveduras	Bolores	Leveduras	Bolores
1º Tapete de lavagem da linha 3	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
	2ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
Vibrador da linha 3	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)
	2ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)	Moderado (1 ufc/cm ²)
Tapete elevador de embalagem da linha 4	1ª	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)	Bom (0 ufc/cm ²)	Moderado (1 ufc/cm ²)

Não foi detetada qualquer contaminação por leveduras e só foram detetadas duas amostras com bolores – com um resultado classificado como Moderado - aos 5 dias de incubação, nomeadamente, na 2ª amostra do vibrador da linha 3 e na única amostra do tapete elevador de embalagem da linha 4.

4.2 Contaminação da matéria-prima

No Quadro 18 podem-se observar os resultados obtidos no 3º ensaio da matéria-prima.

Todos os resultados relativos às superfícies analisadas, mantiveram-se abaixo do valor máximo admissível, com resultados considerados “Satisfatórios” de acordo com o INSA (2019).

De referir que os indicadores de segurança *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* não foram detetados em nenhuma das três amostras, independentemente do momento da recolha, isto é, antes da desinfeção; após a desinfeção e no produto acabado (embalado). Para microrganismos totais a 30°C e para *Enterobacteriaceae*, de uma forma geral, as contagens reduziram-se após a desinfeção (ácido paracético) e subiram, ligeiramente, no produto acabado (embalado).

Quadro 18 Resultados microbiológicos da matéria-prima antes da lavagem, após a desinfeção e no produto acabado.

Zonas de amostragem	Ponto	Contagem de microrganismos a 30 °C (log /g)	Apreciação	Contagem de <i>E. coli</i> (log/g)	Apreciação	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> (log/g)	Apreciação	Contagem de clostrídios sulfito-redutores (log/g)	Pesquisa de <i>Salmonella</i> em 25 g	Pesquisa de <i>L.monocytogenes</i> 25 g
Antes da lavagem	1	5,85	S	<1,00	S	3,65	S	<1,00		
	2	5,90	S	<1,00	S	4,40	S	<1,00	Ausente	Ausente
	3	4,65	S	<1,00	S	4,70	S	<1,00		
Após desinfeção	1	4,90	S	<1,00	S	3,60	S	<1,00		
	2	4,85	S	<1,00	S	4,30	S	<1,00	Ausente	Ausente
	3	5,00	S	<1,00	S	3,70	S	<1,00		
Produto acabado (embalado)	1	5,60	S	<1,00	S	4,45	S	<1,00		
	2	4,95	S	<1,00	S	4,60	S	<1,00	Ausente	Ausente
	3	4,85	S	<1,00	S	3,50	S	<1,00		

S- Satisfatório.

4.3 Contaminação da água do secador

No Quadro 19 podem-se observar os resultados obtidos relativamente à contaminação da água do secador de folhas.

Quadro 19 Resultados relativos à contaminação da água do secador de folhas.

Parâmetros	Resultados
Contagem de microrganismos viáveis a 22±2°C (u.f.c./mL)	3,1x10 ¹
Contagem de coliformes (ufc/100 mL)	0
Contagem de <i>E. coli</i> (ufc/100 mL)	0
Contagem de <i>C. perfringens</i> (ufc/100 mL)	0
Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> (250 mL)	Não detetado
Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> (250 mL)	Não detetado

A observação do Quadro 19 permite verificar que a higiene e segurança da água do secador apresenta níveis normais e expectáveis.

4.4 Valor do pH da água do tanque de desinfecção

O valor médio do pH da água do tanque de desinfecção foi 3,53, situando-se, por isso, no intervalo considerado adequado.



CAPÍTULO V – DISCUSSÃO

5 Discussão dos resultados

5.1 Contaminação das superfícies

5.1.1 Análises convencionais

Por na nossa pesquisa não termos encontrado resultados de outros autores em linhas de produção de produtos de IV gama em alguns casos tivemos que recorrer a referências relativas a outros tipos de linhas de processamento de outros produtos.

5.1.1.1 Contagem de microrganismos a 30°C

Carvalho (2017), em 20 zaragatoas, em diversos itens, só em 3 delas os resultados foram acima do valor alvo de acordo com o critério que adotou (<100 ufc/cm²).

Castro (2008), analisando as condições de higiene, em 8 equipamentos/utensílios, numa unidade de preparação e congelação de carne de aves, só em 1 deles a contaminação foi considerada inaceitável, de acordo com Snyder (1995), citado por Forsythe e Hayes (2002). Magalhães (2010), analisando a contaminação de equipamentos/utensílios, no fabrico de alheiras em cozinhas regionais de fumeiro, em 6 equipamentos e num total de 17 amostras os resultados foram considerados abaixo do valor máximo de contaminação de acordo com Cinar e Onbaşı (2021), com base na adaptação da Decisão da Comissão de 8 de junho de 2001.

Cinar e Onbaşı (2021), num estudo da implementação de um programa de monitorização ambiental numa fábrica de frutas congeladas e de vegetais para identificar microrganismos patogénicos e, conseqüentemente, criar medidas preventivas para reduzir ou eliminar o risco de contaminação cruzada, recolheram 145 amostras em diversas superfícies. Em 48% do total a contaminação foi <10 ufc/cm², considerada aceitável de acordo com o critério que adotaram. Depois da aplicação de um programa de controlo ambiental na empresa, em 228 amostras em diversas superfícies, em 77% do total, a contaminação foi <10 ufc/cm², considerada aceitável de acordo com o critério que adotaram.

Do conjunto destes autores, só Magalhães (2010), obteve resultados idênticos aos verificados no nosso ensaio, onde obtivemos melhores resultados, uma vez que em 5 amostras obtivemos resultados <5 ufc/cm², ou seja, manteve-se abaixo do valor máximo admissível.

5.1.1.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*

Carvalho (2017), em 20 zaragatoas, em diversos itens, só em 2 delas os resultados foram acima do valor alvo de acordo com o critério que adotou (<10 ufc/cm²), pior que os verificados no nosso ensaio, uma vez que nas 5 amostras realizadas no nosso ensaio a contagem de *Enterobacteriaceae* obteve em todas as amostras a todos os equipamentos <5 ufc/cm².

5.1.1.3 Contagem *E.coli*

Kaneko (1999), pretendendo determinar a contaminação do ambiente nas indústrias alimentares e debater o potencial do meio ambiente industrial, incluindo equipamentos, como fontes e veículos para a contaminação de produtos frescos IV gama, em 44 amostras só em 3 foi isolado *E. coli*, enquanto que no nosso ensaio os valores foram <5 ufc/cm² em 5 amostras, ou seja, a contaminação foi considerada satisfatória de acordo com os critérios aplicados.

Cinar e Onbaşı (2021), na implementação de um programa de monitorização ambiental numa fábrica de frutas congeladas e de vegetais para identificar microrganismos patogénicos e, conseqüentemente, criar medidas preventivas para reduzir ou eliminar o risco de contaminação cruzada, recolheram 145 amostras em diversas superfícies. Em 82% do total, a contaminação foi <10 ufc/cm², considerada aceitável de acordo com o critério que adotaram. Depois da aplicação de um programa de controlo ambiental na empresa, em 228 amostras em diversas superfícies, em 100% do total, a contaminação foi <10 ufc/cm², considerada aceitável de acordo com o critério que adotaram.

Magalhães (2010), analisando a contaminação de equipamentos/utensílios, no fabrico de alheiras em cozinhas regionais de fumeiro, em 6 equipamentos e num total de 17 amostras, obteve resultados que podem ser considerados abaixo do valor máximo de contaminação de acordo com Cinar e Onbaşı (2021), com base na adaptação da Decisão da Comissão de 8 de junho de 2001.

De um modo geral, os valores registados nas referências encontradas são idênticos aos resultados que obtivemos (uma contaminação de <5 ufc/cm² em 5 amostras), exceto nos casos de Kaneko (1999), que não isolou o microrganismo em nenhuma das suas amostras, e, no caso de Magalhães (2010), em que as contagens foram <1 ufc/cm² em todas as amostras, exceto numa: 10 ufc/cm².

5.1.1.4 Contagem de bolores e leveduras

Cinar e Onbaşı (2021), na implementação de um programa de monitorização ambiental numa fábrica de frutas congeladas e de vegetais para identificar microrganismos patogénicos e, conseqüentemente, criar medidas preventivas para reduzir ou eliminar o risco de contaminação cruzada, recolheram 145 amostras em diversas superfícies. Em 63% do total, a contaminação foi <10 ufc/cm², considerada aceitável de acordo com o critério que adotaram. Depois da aplicação de um programa de controlo ambiental na empresa, em 228 amostras em diversas superfícies, em 80% do total, a contaminação foi <10 ufc/cm², considerada aceitável de acordo com o critério que adotaram.

Carvalho (2017), em 20 zaragatoas, em diversos itens, só em 2 delas os resultados foram acima do valor alvo de acordo com o critério que adotou (<20 ufc/cm²).

Magalhães (2010), analisando a contaminação de equipamentos/utensílios, no fabrico de alheiras em cozinhas regionais de fumeiro, em 17 amostras, em 6 equipamentos, só em 1 delas o resultado pode ser considerado acima do valor máximo de contaminação de acordo com Cinar e Onbaşı (2021), com base na adaptação da Decisão da Comissão de 8 de junho de 2001.

Os resultados destes autores são idênticos aos nossos, apesar do nosso nível de contaminação nas 5 amostras ser inferior (<5).

5.1.1.5 Contagem *C. perfringens*

Em relação a este parâmetro, na nossa pesquisa não conseguimos identificar nenhum trabalho de outros autores que se refira a este parâmetro.

5.1.1.6 Pesquisa de *L. monocytogenes*

Cinar e Onbaşı (2021), na implementação de um programa de monitorização ambiental numa fábrica de frutas congeladas e de vegetais para identificar microrganismos patogénicos e, conseqüentemente, criar medidas preventivas para reduzir ou eliminar o risco de contaminação cruzada, recolheram 373 amostras em diversas superfícies, em que a *Listeria* spp. esteve ausente.

Cesar (2011), verificando a ocorrência de *L. monocytogenes* na produção de salsichas em duas empresas, 17% das superfícies apresentaram resultado positivo para *L. monocytogenes*, enquanto no nosso ensaio, em todos os equipamentos analisados este microrganismo não foi detetado, tal como aconteceu com Ferraz (2017), que, analisando as possíveis fontes de contaminação por *L. monocytogenes* de queijos fabricados com leite cru, não detetou o microrganismo em 16 amostras de superfícies de equipamentos.

5.1.2 Análises com kits Hygicult®

5.1.2.1 Hygicult®- TPC Microrganismos totais

Lehto *et al.* (2011), analisando resultados de contaminação de superfícies em linhas de produção de produtos vegetais minimamente processados, com uma incubação entre 2-3 dias a 20-25°C, em 41 itens, só num deles a contaminação foi suficientemente baixa para receber a classificação de Bom, em 5 deles a classificação foi Moderada e nos restantes 35 o nível de higiene foi considerado Inaceitável.

Kuisma *et al.* (2014), analisando resultados de contaminação de superfícies em linhas de produção de vegetais minimamente processados para perceber se deviam ser efetuadas mudanças nas práticas de higiene, com uma incubação entre 2-3 dias a 20-25°C, em 42 itens, em 13 deles a contaminação foi classificada como Boa, em 10 deles a contaminação foi considerada como Moderada e nos restantes 19 o nível de higiene foi considerado Inaceitável.

Aydin *et al.* (2007), em 25 equipamentos diferentes, foram recolhidas 70 amostras, incubadas 48h a 30°C. Em 35,71% do total dos equipamentos, os resultados foram classificados como Moderados, nos restantes 64,29%, que correspondiam a 45 equipamentos, os resultados foram classificados como Inaceitáveis.

No nosso ensaio, ao fim 24h de incubação a 35±2°C, no 1º tapete lavagem ambas as amostras apresentaram uma contaminação considerada como Moderada, no vibrador uma contaminação considerada Boa e no tapete elevador embalagem uma contaminação considerada Boa. Ou seja, as contaminações registadas no nosso ensaio apesar da muito menor amostragem, das diferenças de tempo e da temperatura de incubação, evidenciaram um melhor nível de higiene do que as registadas por estes outros autores.

5.1.2.2 Hygicult®- CF – Coliformes

Em relação a este parâmetro não conseguimos identificar nenhum trabalho de outros autores em que tenha sido utilizado o mesmo *kit*.

5.1.2.3 Hygicult®- E- *Enterobacteriaceae*

Em relação a este parâmetro não conseguimos identificar nenhum trabalho de outros autores em que tenha sido utilizado o mesmo *kit*.

5.1.2.4 Hygicult® EB -GUR- Enterobacteriaceae e Enterobacteriaceae – Espécies produtoras da enzima β -glucuronidase

Enterobacteriaceae

Lehto *et al.* (2011), analisando resultados de contaminação de superfícies em linhas de produção de produtos vegetais minimamente processados, com uma incubação entre 2-3 dias a 20-25°C, em tapetes transportadores a contaminação foi classificada como Inaceitável.

Kuisma *et al.* (2014), analisando resultados de contaminação de superfícies em linhas de produção de vegetais minimamente processados para perceber se deviam ser efetuadas mudanças nas práticas de higiene, com uma incubação entre 2-3 dias a 20-25°C, em 42 itens, em 11 deles a contaminação foi classificada como Boa, em 17 deles a contaminação foi considerada como Moderada e nos restantes 14 o nível de higiene foi considerado Inaceitável.

No presente ensaio, ao fim 24h de incubação a 35±2°C e 48h a 27±3°C, a contaminação foi considerada como Boa no 1º tapete de lavagem, no vibrador e no tapete elevador da embalagem, enquanto na 1ª amostra no 1º tapete de lavagem ao fim 48h, a contaminação foi considerada como Moderada, logo, de um modo geral, menor que a detetada por esses autores, apesar da muito menor amostragem.

***Enterobacteriaceae* – Espécies produtoras da enzima β -glucuronidase**

Lehto *et al.* (2011), analisando resultados de contaminação de superfícies em linhas de produção de produtos vegetais minimamente processados, com uma incubação entre 2-3 dias a 20-25°C, em 34 itens, em 2 deles a contaminação foi suficientemente baixa para receber a classificação de Bom, em 5 deles a classificação foi Moderada e nos restantes 24 o nível de higiene foi considerado Inaceitável.

Kuisma *et al.* (2014), analisando resultados de contaminação de superfícies em linhas de produção de vegetais minimamente processados para perceber se deviam ser efetuadas mudanças nas práticas de higiene, em 42 itens, em 9 deles o valor médio da contaminação pôde ser considerado Bom, em 15 deles a classificação foi Moderada e nos restantes 18 o nível de higiene foi considerado Inaceitável.

No presente ensaio, ao fim 24h de incubação a 35±2°C e 48h a 27±3°C, a contaminação foi considerada como Boa no 1º tapete de lavagem, no vibrador e no tapete elevador da

embalagem. Ou seja, as contaminações registadas no nosso ensaio apesar da muito menor amostragem, das diferenças de tempo e da temperatura de incubação, evidenciaram um melhor nível de higiene que as registadas por estes outros autores.

5.1.2.5 Hygicult® Y&F- bolores

Lehto *et al.* (2011), analisando resultados de contaminação de superfícies em linhas de produção de produtos vegetais minimamente processados em 40 itens, em 33 deles, com uma incubação entre 2-3 dias a 20-25°C, a contaminação foi suficientemente baixa para receber a classificação de Bom, em 4 deles a classificação foi Moderada e nos restantes 3 o nível de higiene foi considerado Inaceitável.

Kuisma *et al.* (2014), analisando resultados de contaminação de superfícies em linhas de produção de vegetais minimamente processados para perceber se deviam ser efetuadas mudanças nas práticas de higiene em 42 itens, com uma incubação entre 2-3 dias a 20-25°C, em 36 deles a contaminação foi classificada como Boa, e nos restantes 6 o nível de higiene foi considerado Inaceitável.

No nosso ensaio, após 3 dias de incubação a $27 \pm 3^\circ\text{C}$, apesar do menor volume de amostragem, a contaminação foi considerada como Boa em todos os equipamentos, ou seja, inferior à verificada, de um modo geral, nestes dois outros estudos. Neste caso deste parâmetro os resultados foram equiparáveis em termos de condições de incubação.

5.1.2.6 Hygicult® Y&F- leveduras

Lehto *et al.* (2011), analisando resultados de contaminação de superfícies em linhas de produção de produtos vegetais minimamente processados, em 41 itens, com uma incubação entre 2-3 dias a 20-25°C, em 6 deles a contaminação foi suficientemente baixa para receber a classificação de Bom, em 7 deles a classificação foi Moderada e nos restantes 28 o nível de higiene foi considerado Inaceitável.

Kuisma *et al.* (2014), analisando resultados de contaminação de superfícies em linhas de produção de vegetais minimamente processados para perceber se deviam ser efetuadas mudanças nas práticas de higiene, em 42 itens, com uma incubação entre 2-3 dias a 20-25°C, em 23 deles a contaminação foi classificada como Boa, em 9 deles a contaminação foi considerada como Moderada e nos restantes 10 o nível de higiene foi considerado Inaceitável.

No nosso ensaio, após 3 dias de incubação a $27 \pm 3^\circ\text{C}$, a contaminação foi considerada como Boa em todos os equipamentos. Neste caso deste parâmetro, apesar da nossa menor

amostragem, os nossos resultados evidenciaram um melhor nível de higiene do que o registado por estes outros autores.

5.2 Contaminação da matéria-prima

Não foi considerada a discussão da contaminação da matéria-prima uma vez que o principal objetivo foi a análise da contaminação de superfícies, pois o que nos interessou foi comparar a contaminação das superfícies com a contaminação do produto final, que foi o resultado do processamento na linha em que controlamos a contaminação das superfícies.

5.2.1 Contaminação do produto acabado

5.2.1.1 Contagem de microrganismos a 30°C

Entre diversos trabalhos que identificamos com resultados relativos à contaminação do produto acabado escolhemos quatro, por uma questão de economia de espaço e de tempo e para comparação dos resultados usaram-se os critérios do INSA (2019).

Giusti *et al.* (2010), avaliando a segurança microbiana de vegetais frescos prontos para consumo produzidos por diferentes tecnologias, em 115 amostras em diversos produtos registou-se um valor inferior a 18,3% do total como sendo satisfatório de acordo com o INSA (2019).

Moura (2016), avaliando os fatores de risco de saladas embaladas prontas para o consumo, obteve resultados não satisfatórios de acordo com o INSA (2019).

Abadias *et al.* (2008), só em cerca de 11,9% das amostras obtiveram resultados satisfatórios de acordo com o INSA (2019).

Maistro *et al.* (2012), em oito produtos diferentes, em 11 recolhas, só em 6 delas os resultados foram satisfatórios de acordo com o INSA (2019).

Ou seja, no nosso ensaio (com menor amostragem) os níveis de contaminação foram menores e considerados satisfatórios de acordo com o INSA (2019).

5.2.1.2 Contagem de *Escherichia coli*

Entre diversos trabalhos que identificamos com resultados relativos à contaminação do produto acabado escolhemos três, por uma questão de economia de espaço e de tempo e para comparação dos resultados usaram-se os critérios do INSA (2019).

Giusti *et al.* (2010), avaliando a segurança microbiana de vegetais frescos prontos para o consumo produzidos por diferentes tecnologias, em 115 amostras de diversos produtos registou resultados não satisfatórios de acordo com o INSA (2019).

Tal como no nosso ensaio (com menor amostragem), Maistro *et al.* (2012), em oito produtos diferentes e em 11 recolhas e Moura (2016), obtiveram ambos resultados satisfatórios de acordo com o INSA (2019).

5.2.1.3 Contagem de *Enterobacteriaceae*

Entre diversos trabalhos que identificamos com resultados relativos à contaminação do produto acabado escolhemos três, por uma questão de economia de espaço e de tempo e para comparação dos resultados usaram-se os critérios de INSA (2019).

Fröder *et al.* (2007), analisando a qualidade microbiológica de saladas minimamente processadas, Santos *et al.* (2012), avaliando a contaminação microbiológica de saladas minimamente processadas e Moura (2016), avaliando os fatores de risco de saladas embaladas prontas para consumo, ao contrário do registado no nosso ensaio (com menor amostragem), obtiveram resultados não satisfatórios de acordo com o INSA (2019).

5.2.1.4 Contagem de *Clostridium sulfito-redutores*

Em relação a este parâmetro, na nossa pesquisa não conseguimos identificar nenhum trabalho de outros autores que se refira a este parâmetro.

5.2.1.5 Pesquisa de *Salmonella spp.*

Entre diversos trabalhos que identificamos com resultados relativos à contaminação do produto acabado escolhemos três, por uma questão de economia de espaço e de tempo e para comparação dos resultados usaram-se os critérios de INSA (2019).

Giusti *et al.* (2010), avaliando a segurança microbiana de vegetais frescos prontos para o consumo produzidos por diferentes tecnologias obtiveram uma baixa incidência microbiana e Fröder *et al.* (2007), analisando a qualidade microbiológica de saladas minimamente processadas, em 133 amostras, só em duas evidenciaram a presença de *Salmonella spp.* Enquanto que, tal como no nosso ensaio (com uma pequena amostragem), Santos *et al.* (2012), avaliando a contaminação microbiológica de saladas minimamente processadas, não detetaram este microrganismo.

5.2.1.6 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Entre diversos trabalhos que identificamos com resultados relativos à contaminação do produto acabado escolhemos três, por uma questão de economia de espaço e de tempo e para comparação dos resultados usaram-se os critérios de INSA (2019).

Giusti *et al.* (2010), avaliando a segurança microbiana de vegetais frescos prontos para o consumo produzidos por diferentes tecnologias não detetaram *Listeria spp.*, Fröder *et al.* (2007), analisando a qualidade microbiológica de saladas minimamente processadas, em 133 amostras, só uma evidenciou a presença de *Listeria monocytogenes* e Santos *et al.* (2012), avaliando a contaminação microbiológica de saladas minimamente processadas, registou uma baixa incidência microbiana.

No nosso ensaio, provavelmente com uma diminuta amostragem, não foi detetado o microrganismo.

5.3 Contaminação da água do secador

Cesar (2011), na produção de salsichas em duas empresas, não detetou *E. coli* em água de lavagem e de “sanitização”, mas detetou NMP/100 mL entre 3 a >16 em coliformes a 35°C e a 45°C, enquanto que no nosso ensaio (com menor amostragem) estes dois microrganismos não foram detetados.

Nas nossas pesquisas não foi possível obter mais referências para comparação.

5.4 Valor do pH da água do tanque de desinfecção

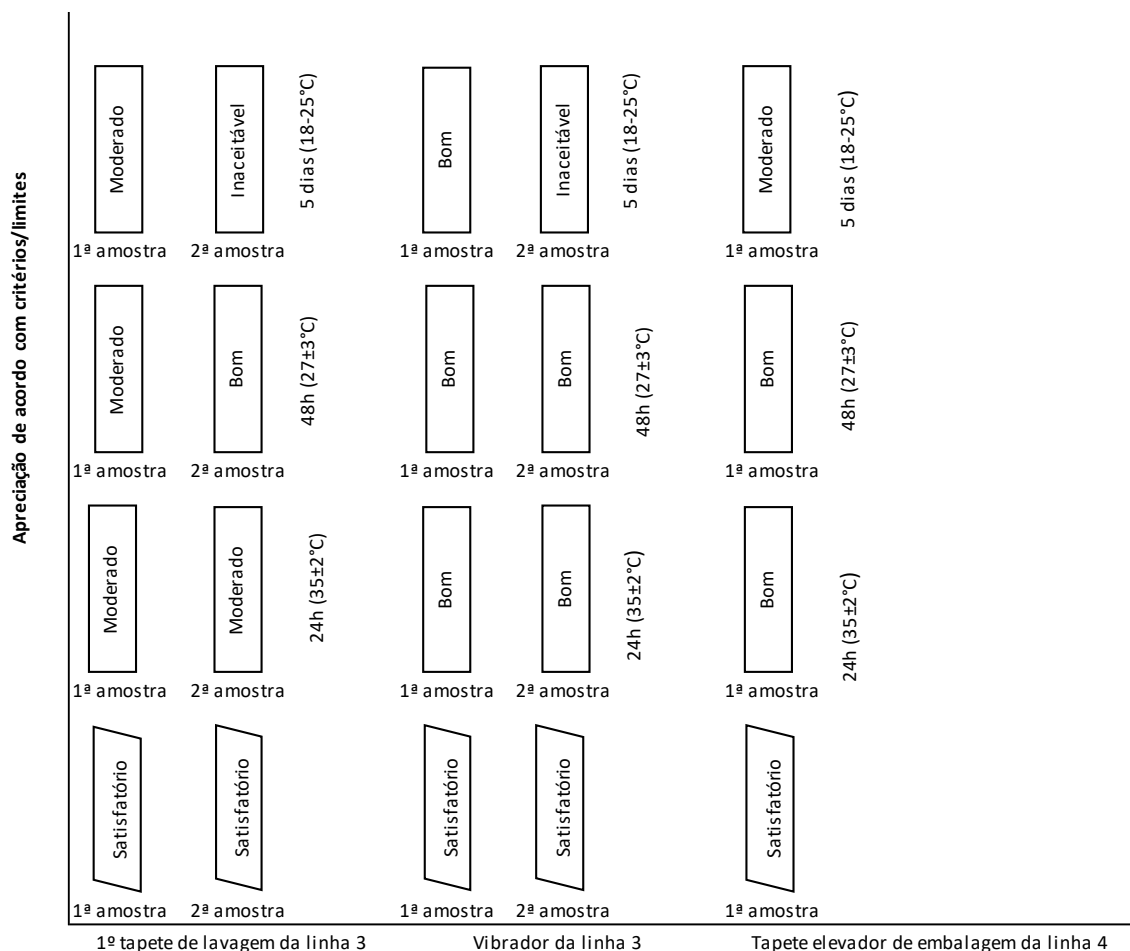
Em relação a este parâmetro não conseguimos identificar nenhum trabalho de outros autores em que o mesmo tenha sido medido, apesar do nosso resultado evidenciar uma contaminação de 3,53, situando-se, por isso, no intervalo considerado adequado.

5.5 Relação entre o método convencional e o método alternativo nas superfícies analisadas

Nos seguintes gráficos pode observar-se a relação existente entre o método convencional e o método alternativo nas superfícies analisadas.

5.5.1 Microrganismos totais a 30°C

Na Figura 3 pode observar-se a relação entre o método convencional e o método alternativo relativamente aos microrganismos totais a 30°C.



Os paralelogramos representam as análises do método convencional; os retângulos representam as análises do método alternativo Hygicult®; métodos convencionais- foram colhidas duas amostras, exceto no tapete elevador de embalagem da linha 4, onde foi colhida uma única amostra; kits Hygicult® - foram colhidas duas amostras, exceto no tapete elevador de embalagem da linha 4, onde foi colhida uma única amostra.

Figura 3 Relação entre o método convencional e o método alternativo nos Microrganismos a 30°C.

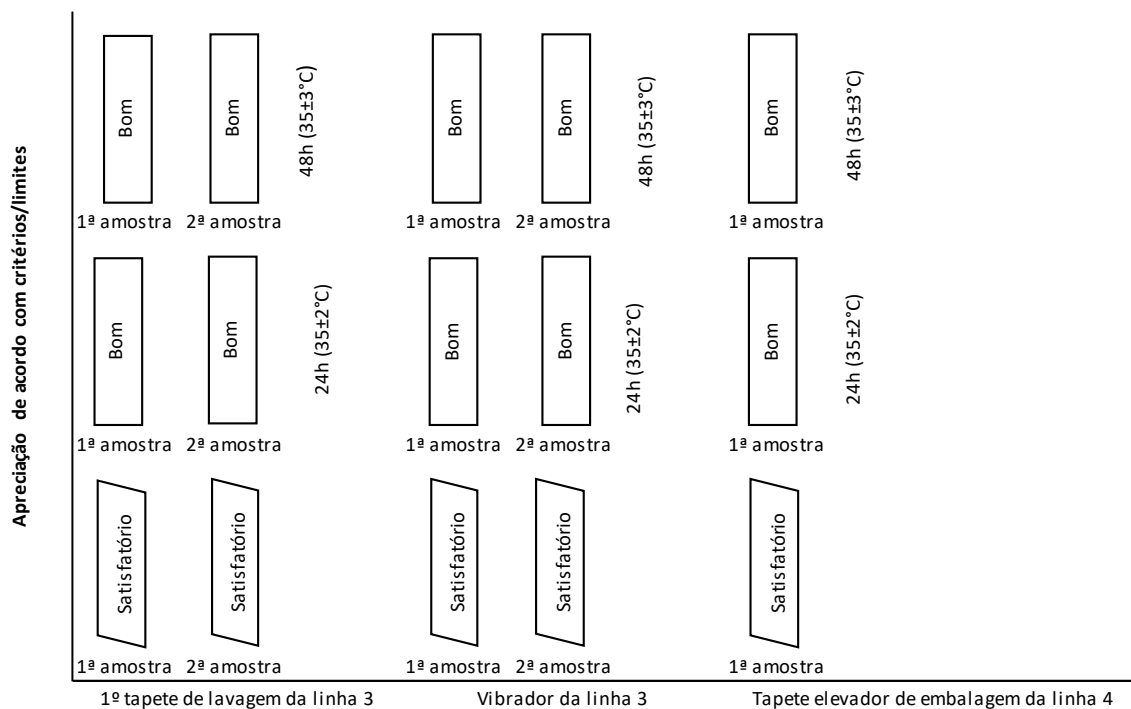
As análises microbiológicas realizadas às superfícies para detetar os microrganismos a 30°C revelaram que os resultados, de acordo com os critérios aplicados e com a utilização do método convencional, foram satisfatórios. No que diz respeito à utilização dos kits, nos dois primeiros períodos de incubação os resultados foram, de acordo com os critérios dos fabricantes, considerados entre Bom e Moderado, já no terceiro período de incubação

foram verificadas duas amostras classificadas como Inaceitável na 2ª amostras do 1º tapete de lavagem da linha 3 e na 2ª amostra do vibrador da linha 3. Na 3ª superfície analisada no tapete de embalagem da linha 4, no período de incubação de 5 dias (18-25°C), a única amostra teve uma classificação de Moderada.

Assim sendo, pode considerar-se que ambos os procedimentos utilizados tiveram um desempenho semelhante, se considerarmos o tempo de incubação do *Kit* de 48h, o que significa que os métodos podem ser aceites e considerados como adequados à utilização da rotina pretendida, se esse tempo de incubação for adotado para este parâmetro.

5.5.2 *Enterobacteriaceae*

Na Figura 4 pode observar-se a relação entre o método convencional e o método alternativo relativamente às *Enterobacteriaceae*.



Os paralelogramos representam as análises do método convencional; os retângulos representam as análises do método alternativo Hygicult®; métodos convencionais- foram colhidas duas amostras, exceto no tapete elevador de embalagem da linha 4, onde foi colhida uma única amostra; kits Hygicult®- foram colhidas duas amostras, exceto no tapete elevador de embalagem da linha 4, onde foi colhida uma única amostra.

Figura 4 Relação entre o método convencional e o método alternativo na *Enterobacteriaceae*.

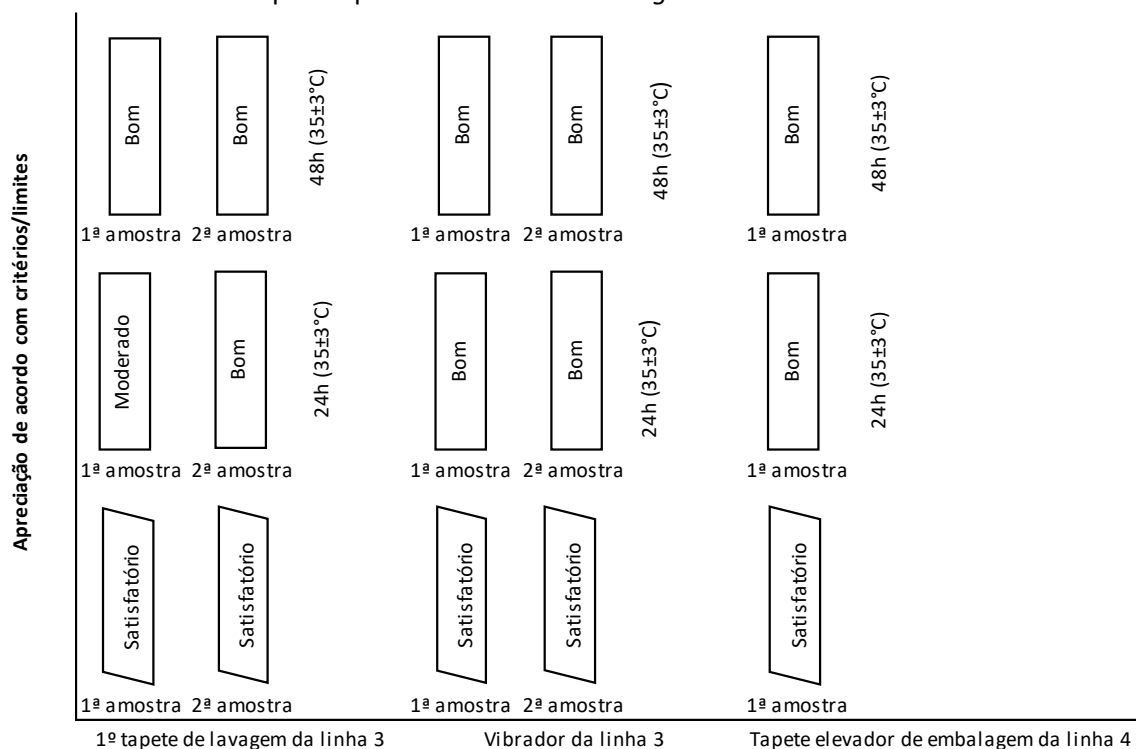
As análises microbiológicas realizadas às superfícies para detetar *Enterobacteriaceae* revelam que os resultados, de acordo com os critérios aplicados e com a utilização do

método convencional, foram satisfatórios. No que diz respeito à utilização dos *kits*, nos dois períodos de incubação os resultados foram, de acordo com os critérios dos fabricantes, considerados como Bom.

Assim sendo, pode considerar-se que ambos os procedimentos utilizados tiveram um desempenho semelhante com o Hygicult® incubado nos dois períodos de tempo, o que significa que os métodos podem ser aceites e considerados como adequados à utilização da rotina pretendida.

5.5.3 Espécies produtoras da enzima β -glucuronidase

Na Figura 5 pode observar-se a relação entre o método convencional e o método alternativo relativamente às espécies produtoras da enzima β -glucuronidase.



Os paralelogramos representam as análises do método convencional; os retângulos representam as análises do método alternativo Hygicult®; métodos convencionais- foram colhidas duas amostras, exceto no tapete elevador de embalagem da linha 4, onde foi colhida uma única amostra; kits Hygicult®- foram colhidas duas amostras, exceto no tapete elevador de embalagem da linha 4, onde foi colhida uma única amostra.

Figura 5 Relação entre o método convencional e o método alternativo nas espécies produtoras da enzima β -glucuronidase.

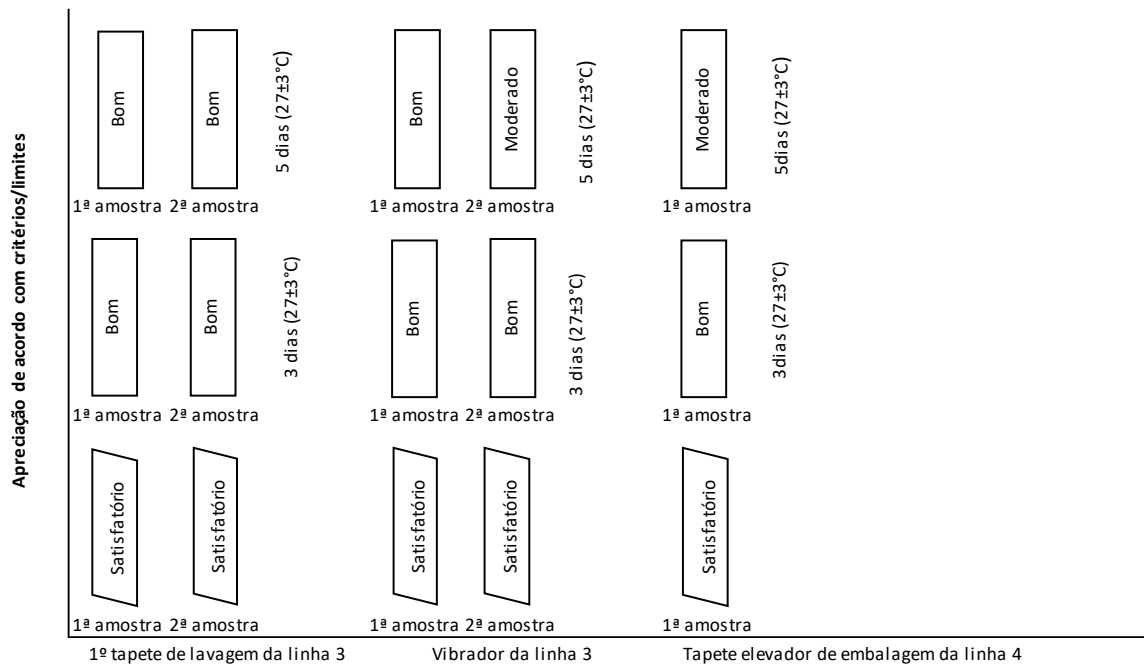
As análises microbiológicas realizadas às superfícies para detetar espécies produtoras da enzima β -glucuronidase revelaram que os resultados, de acordo com os critérios aplicados e com a utilização do método convencional, foram satisfatórios. No que diz respeito à

utilização dos kits, nos dois períodos de incubação os resultados foram, de acordo com os critérios dos fabricantes, considerados Bom e só num caso Moderado (1º tapete de lavagem da linha 3 na 1ª amostra do período de 24h).

Assim sendo, pode considerar-se que ambos os procedimentos utilizados tiveram um desempenho semelhante com o Hygicult® incubado nos dois períodos de tempo, o que significa que os métodos podem ser aceites e considerados como adequados à utilização da rotina pretendida.

5.5.4 Bolores

Na Figura 6 pode observar-se a relação entre o método convencional e o método alternativo relativamente aos bolores.



Os paralelogramos representam as análises do método convencional; os retângulos representam as análises do método alternativo Hygicult®; métodos convencionais- foram colhidas duas amostras, exceto no tapete elevador de embalagem da linha 4, onde foi colhida uma única amostra; kits Hygicult®- foram colhidas duas amostras, exceto no tapete elevador de embalagem da linha 4, onde foi colhida uma única amostra.

Figura 6 Relação entre o método convencional e o método alternativo nos bolores.

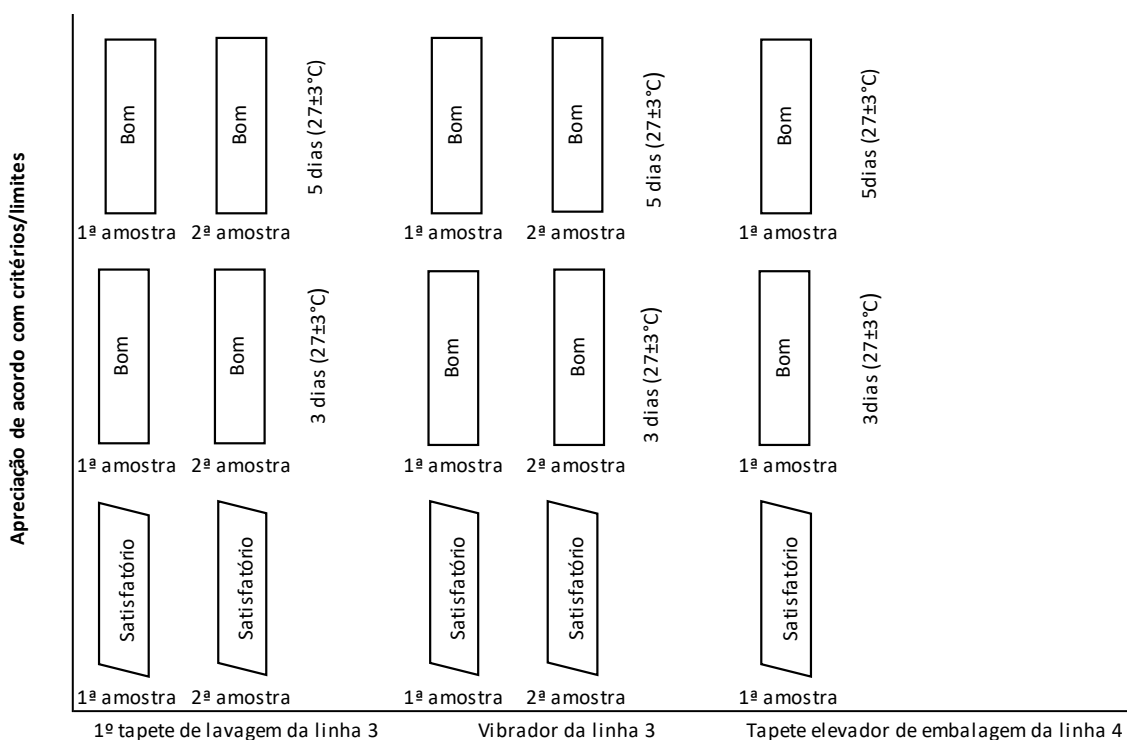
As análises microbiológicas realizadas às superfícies para detetar bolores revelaram que os resultados, de acordo com os critérios aplicados e com a utilização do método convencional, foram satisfatórios. No que diz respeito à utilização dos kits, nos dois períodos de incubação os resultados foram, de acordo com os critérios dos fabricantes, considerados Bom e em

dois casos Moderado (vibrador da linha 3 na 2ª amostra do período de 5 dias e no tapete elevador de embalagem da linha 4 na 1ª amostra e única amostra do período de 5 dias).

Assim sendo, pode considerar-se que ambos os procedimentos utilizados tiveram um desempenho semelhante com o Hygicult® incubado nos dois períodos de tempo, o que significa que os métodos podem ser aceites e considerados como adequados à utilização da rotina pretendida.

5.5.5 Leveduras

Na Figura 7 pode observar-se a relação entre o método convencional e o método alternativo relativamente às leveduras.



Os paralelogramos representam as análises do método convencional; os retângulos representam as análises do método alternativo Hygicult®; métodos convencionais- foram colhidas duas amostras, exceto no tapete elevador de embalagem da linha 4, onde foi colhida uma única amostra; kits Hygicult®- foram colhidas duas amostras, exceto no tapete elevador de embalagem da linha 4, onde foi colhida uma única amostra.

Figura 7 Relação entre o método convencional e o método alternativo nas leveduras.

As análises microbiológicas realizadas às superfícies para detetar leveduras revelaram que os resultados, de acordo com os critérios aplicados e com a utilização do método convencional, foram satisfatórios. No que diz respeito à utilização dos kits, nos dois períodos

de incubação os resultados foram, de acordo com os critérios dos fabricantes, considerados como Bom.

Assim sendo, podemos considerar que ambos os procedimentos utilizados tiveram um desempenho semelhante com o Hygicult® incubado nos dois períodos de tempo, o que significa que os métodos podem ser aceites e considerados como adequados à utilização da rotina pretendida.

CAPÍTULO VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 Considerações finais

As análises realizadas às superfícies nos dois métodos utilizados convencional e alternativo Hygicult®, não revelaram contaminações significativas, com exceção das análises realizadas com recurso ao método alternativo Hygicult®, onde foram apresentados alguns resultados Moderados e Inaceitáveis, em alguns dos parâmetros estudados, nomeadamente:

- Detecção de Microrganismos totais a 30°C

- 1º tapete de lavagem da linha 3:
 - Resultados Moderados: 1ª e 2ª amostra no período de 24 h, 1ª amostra no período de 48H e 1ª amostra no período de 5 dias;
 - Resultados Inaceitáveis: 2ª amostra no período de 5 dias.
- Vibrador da linha 3:
 - Resultados Inaceitáveis: 2ª amostra no período de 5 dias.
- Tapete elevador de embalagem da linha 4:
 - Resultados Moderados: 1ª amostra no período de 5 dias.

- Detecção de Espécies produtoras da enzima β -glucuronidase

- 1º tapete de lavagem da linha 4:
 - Resultados Moderados: 1ª amostra no período de 24 h.

- Detecção de Bolores

- Vibrador da linha 3:
 - Resultados Moderados: 2ª amostra no período de 5 dias.
- Tapete elevador de embalagem da linha 4:
 - Resultados Moderados: 1ª amostra no período de 5 dias.

No que diz respeito às análises realizadas antes, após e no produto acabado com recurso ao método convencional, não foram reveladas contaminações significativas, com exceção daquelas que foram realizadas para a deteção dos Microrganismos a 30°C, onde foram apresentados resultados Moderados INSA (2019).

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM

No que diz respeito às análises realizadas à água do secador de folhas à saída da desinfeção com recurso ao método convencional, não foram reveladas contaminações significativas, o que significa que todos os resultados apresentados foram Satisfatórios.

Nas análises microbiológicas realizadas às superfícies, utilizando qualquer um dos dois métodos convencional e alternativo Hygicult®, os resultados obtidos indicam que a maioria dos pontos analisados não apresentaram contaminações microbiológicas. Assim sendo, ambos os procedimentos analisados tiveram um desempenho semelhante, o que significa que os métodos se encontram adequados à utilização na rotina da análise pretendida.

O estudo microbiológico efetuado ao produto final evidenciou, num nível Satisfatório. Consequentemente, este resultado sugere que o nível de contaminação do ambiente de produção na linha, ao longo deste estudo, parece não causar impacto na qualidade microbiológica do produto final. Coincidindo nos resultados das análises das contaminações através da utilização de apenas um dos métodos, nomeadamente, o método convencional. Não foi possível ter outra robustez ao nível dos resultados, uma vez que o confinamento imposto impediu posteriores visitas à mesma empresa e a outras, de modo a aumentar o número de análises em ambientes industriais em que se poderiam comparar os dois métodos de análise.

Como continuação deste trabalho haveria necessidade de estender o estudo a outras unidades de processamento de outros produtos e também aí validar ou não as conclusões obtidas no atual estudo.

Seria também interessante analisar os resultados de diferentes superfícies ao longo do período/turno de produção e incluir a análise da matéria-prima inicial e do produto final em cada sessão de colheita de amostras, para além de outras.

Nestes ensaios dever-se-ia ainda analisar o tempo de incubação adequado ao controlo relativamente a cada parâmetro analisado com o *kit*.

Por último, os resultados deveriam ser acompanhados da análise dos custos bem como da eficiência do uso de *kits* no(a) controlo/redução das contaminações nos diferentes locais de colheita.



CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 Referências bibliográficas

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C. e Viñas, I. (2008). *Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments*. International Journal of Food Microbiology 123:121–129.

Abadias, M. (2011). *Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple*. Postharvest Biology and Technology, 59, 289–297.

Afonso, A. (2008). Análise de perigos: *Identificação dos perigos e avaliação dos riscos para a segurança alimentar*, Segurança e qualidade alimentar, (5), pp. 26–29.

Ahern, S.M., Caton, S.J., Bouhlal, S., Hausner, H., Olsen, A., Nicklaus, S., Moller, P. e Hetherington, M.M. Eating a Rainbow. (2013). *Introducing vegetables in the first years of life in 3 European countries*. Appetite, v. 71, p. 48–56.

Almeida, D. (2005). *Manuseamento de produtos hortofrutícolas*. Porto: sociedade portuguesa de inovação.

Anderson, M. e Pascual, V. (2000). *Microbiologia alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2ª Edición. Madrid: Díaz de Santos, S.A. ISBN 847978-424-5. 441 p.

Araújo, M. (1997). *Segurança Alimentar: Os perigos para a saúde através dos alimentos*. Lisboa: Meriberica/Liber.

Artés, F. e Allende, A. (2005). *Minimal Fresh Processing of Vegetables, Fruits and Juices*. Em Sun, Da-Wen (Ed.). *Emerging Technologies for Food Processing*. 1. ed.: Elsevier Ltd, pp. 677–716.

Arvanitoyannis, I. S. e Kassaveti, A. (2009). *HACCP and ISO 22000 - A comparison of the two systems*. In: Arvanitoyannis (ed.), I. S., *HACCP and ISO 22000: Application to foods of animal origin*, Oxford: Wiley Blackwell Limited, UK, pp. 3-45.

Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, (ASAE), (2014). *Perigos de origem Alimentar*. Lisboa.

Ayala-Zavala, J.F. e González-Aguilar, G.A. (2011). *Use of Additives to Preserve the Quality of Fresh-Cut Fruits and Vegetables*. Em Martín-Belloso, Olga; Solivaforuny, Robert, C. (Eds.) - *Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing*. 1. ed.: CRC Press, Taylor & Francis Group. pp. 231–254.

- Aydin, A., Aksu, H. e Arun, O. O. (2007). Hygienic properties of food handlers and equipment in food production and sales units. *Medycyna Wet.* 63(9):1067-1070.
- Azeredo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Neto, N.J.G. e Oliveira, M.E.G.O. (2011). *Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables.* *Food Research International*, v. 44, n. 5, p. 1541–1548.
- Baptista, P. e Venâncio, A. (2003). *Os Perigos para a Segurança Alimentar no Processamento de Alimentos.* (Vol. 1). (L. Forvisão, Ed.) Guimarães, Portugal.
- Baptista, P. e Linhares, M. (2005). *Higiene e Segurança Alimentar na Restauração* Volume I- Iniciação. Guimarães: Forvisão- Consultoria em Formação Integrada. S.A.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Fernández-Molina, J.J., Alzamora, S.M., Tapia, M.S.; López-Malo, A. e Chanes, J.W. (2003). *Handling and preservation of fruits and vegetables by methods for rural areas.* Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Bastos, M. (2006). *Frutas Minimamente Processadas: Aspectos de Qualidade e Segurança.*
- Bean, N. H. *et al.* (1997). *Surveillance for foodborne disease outbreaks. World Health Statistics Quarterly.*
- Beulens, A. J., Broens, D. F., Folstar, P. e Hofsted, G. J. (2005). *Food safety and transparency in food chains and networks Relationships and challenges.* *Food Control* 16, 481-486.
- BioMérieux, S.A. (2009). 12695 G -pt. Folheto Informativo - REF 43 641 / 43 649, *Gelose chromID Ottaviani Agosti.* Buchholz A. L.; Davidson G. R.; Ryser, E. T. (2011). *Microbiology of fresh and processed vegetables.* In: Sinha N.K. (ed.), *Handbook of vegetables and vegetable processing.* Blackwell Publishing, pp. 159-181.
- Bryan, F. L. *et al.* (1997). *Guia de procedimentos para implantação do método de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC).* Tradução Gillian Alonso Arruda. São Paulo: Ponto Crítico.
- Bubert, A., Riebe, J., Schnitzler, N., Schonberg, A., Goebel, W. e Schubert, P. (1997). *Isolation of Catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from Listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR.* *Journal of Clinical Microbiology* 35, 179-183.

Buckley, M., Cowan, C. e McCarthy, M. (2007). *The convenience food market in Great Britain: convenience food lifestyle (CFL) segments*. *Appetite*, v.49, n.3, p.600–17, 2007.

Cardamone, C. *et al.*, (28 de february de 2015). *Assessment of the microbiological quality of fresh produce on sale in Sicily, Italy: preliminary results*. *Journal of Biological Research*, 1-6.

Carvalho, T. P. (2017). *Validação de procedimentos de higienização numa indústria alimentar*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica. Instituto técnico de Lisboa.

Castro, S. A. R. S. (2008). *Boas práticas de higiene: um pilar para a produção de alimentos seguros*. Dissertação de Mestrado integrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.

Cenci, S.A. (2011). *Processamento mínimo de frutas e hortaliças*. Em Cenci, Sergio Agostinho (Ed.) (2011). *Processamento mínimo de frutas e hortaliças*. 1. ed.: Embrapa Agroindústria de Alimentos. pp. 1–14.

Cesar, A., Mesquita, A., Prado, C., Nunes, I. e Filho, E. (2011). *Listeria spp. e Listeria monocytogenes na produção de salsichas tipo Hot Dog*. *Ci. Anim.* 12(2):339-352.

Chaim, A. (2006). *Recomendações Básicas para a aplicação das Boas Práticas agropecuárias e de fabricação na Agricultura Familiar*. 1. ed. [S.l.]: Embrapa Informação Tecnológica.

Churchill, R. L. T., Lee, H. e Hall, J. C. (2006). *Detection of Listeria monocytogenes and the toxin listeriolysin*. O in food. *Journal of Microbiological Methods* 64, 141-170. Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables CAC/RCP 1-1969. (2003). Codex Alimentarius Commission. *General Principles of Food Hygiene* (Vol. 4). Rome: FAO/OMS.

Cinar, A. e Onbaşı, E. (2021). Monitoring environmental microbiological safety in a frozen fruit and vegetable plant. *Food Sci. Technol.* 41(1): 232-237.

Codex Alimentarius. (2013). *Principles and Guidelines for establishment and application of microbiological criteria related to foods*. CAC/GL 21 – 1997.

Colelli, G. e Elia, A. (2009). *I prodotti ortofruttili di IV gamma: aspetti fisiologici e tecnologici*. Review n. 9 – *Italus Hortus*, v.16, p.55-78.

Comissão das Comunidades Europeias, (2005). “*Documento de orientação sobre a aplicação de procedimentos baseados nos princípios HACCP e sobre a simplificação da aplicação dos princípios HACCP em determinadas empresas do sector alimentar*”.

Doyle, M.P. e Beuchat, L.R. (2007). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3rd Ed. ASM Press, Washington, D.C.

European Food Safety Authority, (EFSA), (2018). *Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of nonanimal origin*. Part 2 (Salmonella and Norovirus in leafy greens eaten raw as salads).

European Food Safety Authority, (EFSA), (2014). *Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of nonanimal origin*. Part 2 (Salmonella and Norovirus in leafy greens eaten raw as salads).

European Food Safety Authority, (EFSA), (2011). *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union*.

Fang, T., Liu, Y. e Huang, L. (2013). *Growth kinetics of Listeria monocytogenes and spoilage microorganisms in fresh-cut cantaloupe*. Food Microbiology.

Ferraz, A.R.S. (2017) . *Estudo das vias de contaminação de Listeria monocytogenes numa queijaria, PFGE, serotipagem, WGS e resistência a desinfetantes*. Relatório para obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária.

Ferreira, W. e Sousa, J. (2000). *Microbiologia*. Vol.2 Lidel – Edições Técnicas, Lda. Lisboa.

Food and Agriculture Organization, (FAO), (2016). *Traditional microbiological quality control*.

Food and Agriculture Organization, (FAO), (2011). *Processing of fresh-cut tropical fruits and vegetables: A Technical Guide*. (R. S. Rolle, Ed.) Bangkok, Thailand: FAO Regional Office for Asia and the Pacific.

Food and Agriculture Organization, (FAO), (2010). *Processing of fresh-cut tropical fruits and vegetables: A Technical Guide*. (R. S. Rolle, Ed.) Bangkok, Thailand: FAO Regional Office for Asia and the Pacific.

Food and Agriculture Organization, (FAO). e World Health Organization, (WHO), (2002). *PAN_European conference on food safety and quality*.

Food and Drug Administration, (FDA), (7 de Outubro de 2009). *The Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook* [em linha]. U.S Food and Drug Administration.

Food and Drug Administration, (FDA), (2008). *Orientação para a Indústria: Guia para minimizar os riscos de segurança alimentar microbiana de frutas e legumes frescos*.

Food Safety Watch, (28 de January de 2016). *Can pre-packed salads ever be completely safe*. Disponível em Food Safety Whatch, The Science of Safe Food.

Food Safety Watch, (27 de February de 2009). *Salad Days an investigation into the microbiological safety of prepared salads*.

Forsythe, S. J. e Hayes, P. R. (2002). *Higiene de los alimentos: microbiología y HACCP*. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 512pp.

Forsythe, S. J. (2002). *“Microbiologia da Segurança Alimentar”* (Guimarães, M. C. M. e Leonhardt, C. trads.). Editora Artmed. (Livro original em inglês publicado em 2000). Porto Alegre. Regional Office for Asia and the Pacific.

Forsythe, S. J. (2000). *The Microbiology of safe Food*. 1a Edição. Osney Mead, Oxford, Reino Unido: Blackwell Science Ltd.

Framegas, D.P.D.F. (2012). *Impacto da contaminação dos alimentos prontos a comer na saúde pública* (Tese de Mestrado). Universidade de Aveiro, Portugal.

Fröder. R., Martins, R., Souza, K.L.O., Landgraf, M., Franco, B.D. e Destro, M. (2007). *Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation*. *Journal of Food Protection*. 70:1277-1280.

Gil, M. I. (2009). *Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions*. *International Journal of Food Microbiology*.

Gil, M. I. et al. (2015). *Pre-and post-harvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

Giusti, M. D., Aurigemma, C., Marinelli, L., Tufi, D., Medici, D. D., Pasquale, S. D., Vito, C. D. e Boccia, A. (2010). *The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy* *Journal of Applied Microbiology*.109:996–1006.

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2019). *Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: Valores-guia*. Lisboa: INSA IP.

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

Guiné, Raquel. (2012). *Projeto de uma Indústria de Produtos Minimamente Processados*. Millenium, 43 (junho/dezembro). Pp. 163-176.

Gutiérrez, L., Sánchez, C., Batlle, R. e Nerín, C. (2009). *New antimicrobial active package for bakery products*; *Trends in Food Science & Technology*, 20: 92 –99.

Hajdenwurcel, J.R. (1998). *Atlas de Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Fonte comunicações e Editora.

Hajmeer, M. N. e Fung, D. Y. (2006). *Infections with other bacteria*. In H. P. Riemann, & D. O. Cliver (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications* (3rd ed.) (pp. 341-343). London: Elsevier.

Health Protection Agency. (2009). *Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market*. London, England: Health Protection Agency.

Hernández, A. E. et al. (2014). *Aplicación de Tecnología de Barreras para la Conservación de Mezclas de Vegetales Mínimamente Procesados*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 67 (1), 7237-7245.

Hozová, B., Turicová, R. e Lenkeyová, I. (2002). *Microbiological and sensory quality of stored croissant-type bakery products depending on external (sorbic acid) and internal (dough, aw value) conditions*; *Nahrung/Food*, 46: 144 – 150.

Huang, Y. e Chen, H. (2011). *Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of Escherichia coli O157: H7 on baby spinach*. *Food Control*, vol. 22, n. 8, p. 1178-1183.

Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), (2015). *Minimamente processados*. Universidade federal de Uberlândia.

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), (2019). *Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar*. Departamento de Alimentação e Nutrição Unidade de Referência Laboratório de Microbiologia. Lisboa: INSA IP.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), (2000). *Microorganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración*. Volumen 1. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España.

ISO 18593 (2018). *Microbiology of the food chain — Horizontal methods for surface sampling*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 22000 (2018). *Sistemas de gestão da qualidade: Requisitos para qualquer organização que opere na cadeia alimentar*. Instituto Português da Qualidade. Monte da Caparica.

ISO 18593:2 (2018). *Microbiology fo the food chain- Horizontal methods for surface sampling. Compass Listeria Agar- AFNOR BKR 23/2-11/02; ponto 9 e 10*.

ISO 16140:2 (2016). *Microbiology fo the food chain- Method validation- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Rapid'Enterobacteriaceae AFNOR BRD:07/24-11/13*.

ISO 16140:2 (2016). *Microbiology fo the food chain- Method validation- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Rapid Salmonella AFNOR BRD:07/11-12/05*.

ISO 14189 (2013). *Water quality — Enumeration of Clostridium perfringens — Method using membrane filtration*. Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 4833:1 (2013). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms*. Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 19250 (2010). *Water quality — Detection of Salmonella spp*. Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 21527:1 (2008). *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds*. Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 16266 (2006). *Water Quality-Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa Method by membrane filtration*: International Standard Organization, Geneva, Switzerland.

ISO 7937 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens*. Colony-count technique. Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 21528:2 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method*. Switzerland: ISO.

ISO 15213 (2003). *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions*. Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 6579 (2002). *International Standard – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.* International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO 16649:2 (2001). *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli*. Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 6222 (1999). *Water quality — Enumeration of culturable micro-organisms — Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*. Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 11290:2 (1998). *Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method (ISO 11290-2:1998).

ISO 11290:1 (1996). *International Standard – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Listeria monocytogenes. Part 1: Detection method*. International Organization for Standardization, Switzerland.

Jay, J. M. (2006). *Modern food microbiology, 6th ed.*, Aspen Publishers, Inc.

Jay, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology (6th ed.)*. Gaithsburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc. JAY. J. M. Microbiologia de alimentos. 6ed. Porto alegre. Artmed, 2005.711p.

Jofré, A., Martin, B., Garriga, M., Huges, M., Pla, M., Rodríguez-Lázaro, D. E Aymerich, T., (2005). *Simultaneous detection of Listeria monocytogenes and Salmonella by multiplex PCR in cooked ham*. Food Microbiology 22, 109-115.

Kaneko, K., Hayashidani, H., Takahashi, K., Shiraki, Y., Limawongpranee, S. e Ogawa, M. (1999). *Bacterial Contamination in the Environment of Food Factories Processing Ready-to-Eat Fresh Vegetables* Journal of Food Protection. 62(7):800-804.

Kitinoja, L. e Gorny, J.R. (1999). *Fresh-Cut Produce. Em Postharvest Technology for Small-Scale Produce Marketers: Economic Opportunities, Quality and Food Safety*. 1. ed. [S.I.]: UC Postharvest Technology Research and Information Center in association with the USAID/Agricultural Commercialization and Enterprise Project. p. 12.112.12.

Kotzekidou, P. (2013). *Survey of Listeria monocytogenes, Salmonella spp. and Escherichia coli O157:H7 in raw ingredients and ready-to-eat products by commercial real-time PCR kits*. Food Microbiology 35, 86-91.

Kuisma, R., Pienmunne, E., Lehto, M.e Kymalainen, H.R. (2014). *Surface hygiene in vegetable processing plants: results of a repeated hygiene survey*. Journal of hygienic engineering and design. 7:56-60.

Lab M Limited, (setembro de 2006). *Pseudomonas Agar Base*.

Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M. E García.Valdés. E. (2020). *Genomics in bacterial taxonomy: 32 Impact on the genus Pseudomonas*. Genes (Basel). 11(2):1–18. doi:10.3390/genes11020139.

Lampel, K.A., Al-Khalidi, S. e Cahill, S.M. (2012). *Bad Bug Book—Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. Washington, DC: US Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services.

Lehto, M., Kuisma, R., Määttä, J., Kymäläinen, H.R. e Mäki, M. (2011). *Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants*. Food Control. 22:469-475

Lelieveld, H. L. M., Mostert, M. A. e Hola, J. (2005). *Handbook of hygiene control*. England: Woodhead Publishing. ISBN-13: 978-1-85573-957-4.

López-Campos, G., Martínez, S. J. V., Aguado-Urda, M. e López-Alonso, V. (2012). *“Detection, Identification, and Analysis of Foodborne Pathogens*. Em Microarray Detetion and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens (Secção 2).

Machado, A. e Silvestre, L. (2005). *Contaminação dos Alimentos – Segurança Alimentar na Restauração: Guia de Apoio ao Formador*. Qualigénese - Investigação e Formação, Lda.

Magalhães, A. L. M. (2010). *Avaliação das condições higio-sanitárias de cozinhas regionais de fumeiro e sua influência na qualidade microbiológica do produto final*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária de Bragança.

Mahajan, P., Luca, A. e Edelenbos, M. (2014). *Impact of Mixtures of Different Fresh-Cut Fruits on Respiration and Ethylene Production Rates*. Journal of Food Science, 79 (7), 1366-1371.

Maistro, L. C., Miya, N. T. N., Sant’Ana, A. S. e Pereira, J. P. (2012). *Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP e Brazil, as assessed by traditional and alternative methods*. Food Control 28:258-264.

Maller, R. R. (2011). *The impact of factory layout on hygiene in food factories*. In: Holah, J. e Lelieveld, H. L. M. (Eds). *Hygienic design of food factories, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 216*, pp. 217-226.

Marín, S., Guynot, M., Sanchis, V., Arbonés, J. e Ramos, A. (2002). *Aspergillus Flavus, Aspergillus Niger, and Penicillium Corylophilum Spoilage Prevention of 78 Bakery Products by Means of Weak-Acid Preservatives*; Journal of Food Science, 67: 2271 – 2277.

Matos, L.R.D. (2014). *Microbiologia Preditiva Aplicada à análise de amostras de carne de vaca e porco*.

Mendes, R., Coelho, A. e Azeredo, R. (2011). *Contaminação por Bacillus cereus em superfícies de equipamentos e utensílios em unidade de alimentação e nutrição*. Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa. Avenida Peter Henry Rolfs. Rio de Janeiro.

Ministerio de Salud de la República del Perú (2008) RM n.º 591 (2008). *Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano*.

Moldão, M. e Empis, J. (2000). *Produtos Horto-Frutícolas Frescos ou Minimamente processados*. Processamentos mínimos, SPI, Principia, Lisboa, ISBN 972-8589-21-2.

Montville, T. J. e Matthews, K. R. (2000). *Food Microbiology. An Introduction*, 2ª Edição. ASM Press, Washington, DC.

Moore, G. e Griffith, C. (2002). *A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces*. *Food Microbiology*. 19:65-73.

Mossel, D. e Garcia, B. (1985). *Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*. 1ª ed. Española. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. ISBN 84-2000561-4. 375 p.

Moura, F. L. (2016). *Avaliação dos Fatores de Risco de Saladas Embaladas Prontas para Consumir*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Segurança e Qualidade Alimentar na Restauração. Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril.

Murray-Brown Laboratories, Inc. (2014). *Aerobic Plate Count*.

NP 4405 (2002). *Microbiologia alimentar: Regras gerais para a contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30°C*. Instituto Português da Qualidade.

NP 1828 (1982). *Géneros alimentícios. Análise microbiológica. Colheita de amostras*.

Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., LópezMartínez, B., Jiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández-Castro, R. e Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). *Características patogénicas de cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas*. *Bol. Med.Hosp. Infant. Mex.* 70:136–150.

Olmez, H., Kretzchmar, U. (2009). *Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact*. *LWT. Food Science and Technology*, 42, 686-693.

Oxoid Limited. (2010). *Browse Products by Organism*.

Orion Diagnostica. (2008). *Hygicult® instructions for use*. Finland: Orion Diagnostica Oy.

Premier, R. (2013). *Evaluation of vegetable washing chemicals*. Sydney: Horticulture Australia Ltd.

Pan American Health Organization. (PAHO), (2016). *Economic Dimensions of Noncommunicable Diseases in Latin America and the Caribbean* (3 ed.). Washington, U.S.A.: University of Washington.

Pandey, A., Joshi, V., Nigam, P. e Soccol, C. (2000). *Enterobacteriaceae, coliforms and E. coli*. In: Robinson, R., Batt, C. e Patel, P. *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 604610.

Pasha, I. et al. (2014). *Recent Developments in Minimal Processing: A Tool to Retain Nutritional Quality of Food*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54 (3), 340-351.

Penteado, A. L. e Leitão, M. F. F. (2004). *Growth of Listeria monocytogenes in melon, watermelon and papaya puls.* International Journal of Food Microbiology 92, 89-94.

Perry, J., James, A., Morris, K., Oliver, M., Chilvers, K., Reed, R. e Gould, F. (2006). *Evaluation of novel fluorogenic substrates for the detection of glycosidases in Escherichia coli and enterococci.* Journal of Applied Microbiology. 101 (5): 977-85.

Prescott, L.M., Harley, J.P. e Klein, D.A. (2002). *Microbiology.* 5th Edition, The McGraw-Hill Companies. New York, USA.

Regulamento (CE) n.º 1441/2007 *Jornal Oficial da União Europeia* da comissão de 5 de dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 *relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.*

Regulamento (CE) n.º 2073/2005 *Jornal Oficial da União Europeia* (C. d. Europeias, Ed.). Bruxelas: *Relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios* (Vol. 338/1).

Regulamento (CE) n.º 852/2004 *Jornal Oficial da União Europeia*, N.º L 139/1 de 29 de abril de 2004: Parlamento Europeu e do Conselho. *Relativo à higiene dos géneros alimentícios.*

Rico, D., Martindiana, A.B., Barat, J.M. e Barry-Ryan, C. (2007). *Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review.* Trends in Food Science and Technology, v. 18, n. 7, p. 373–386.

Rojas-Grau, M.A., Garner, E. e Martín-Belloso, O. (2011). *The fresh-cut fruit and vegetables industry.* Current situation and market trends. Em Martín-Belloso, Olga.

Salo, S., Alanko, T., Sjöberg, A.M. e Wirtanen, G. (2002). *Validation of the Hygicult® E Dipslides Method in Surface Hygiene Control: A Nordic Collaborative Study.* Journal of AOAC International.

Salo, S., Laine, A., Alanko, T., Sjöberg, A.M. e Wirtanen, G. (2000). *Validation of the Microbiological Methods Hygicult Dipslide, Contact Plate, and Swabbing in Surface Hygiene Control.* A Nordic Collaborative Study. Journal of AOAC International.

Santos, M.I., Cavaco, A., Gouveia, J., Novais, M.R., Nogueira, P.J., Pedroso, L. e Ferreira, M.A.S.S. (2012). *Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal.* Food Control 23:275-281.

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

Santos, M. e Campos Cunha, M. (2007). *Patogénicos Emergentes em Alimentos*. Segurança e Qualidade Alimentar, 2, 10-13.

Sapers, G.M. (2003). *Washing and Sanitizing Raw Materials for Minimally Processed Fruit and Vegetable Products*. Em Novak, John, S.; Sapers, Gerald, M.; Juneja, Vijay, K. (Eds.). Microbial Safety of Minimally Processed Foods. 1. ed. [S.l.]: CRC Press LLC. pp. 222–254.

Sarantópoulos, C.I.G.L. (2011). *Embalagem. Processamento mínimo de frutas e hortaliças: tecnologia, qualidade e sistema de embalagem*. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos., Cap. 4, p. 59-69, 2011.

Scientific Committee on Food. (SCF), (2002). *Risk Profile on the Microbiological Contamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw, Report of the Scientific Committee on Food*. (E. Commission, Ed.) Brussels, Belgium: SCF.

Selma, M.V., Ibanez, A. M., Allende, A., Cantwell, M. e Suslow, T. (2008). *Effect of gaseous ozone and hot water on microbial and sensory quality of cantaloupe and potential transference of Escherichia coli O157:H7 during cutting*. Food Microbiology, vol.25, n. 1, p.162-168. SHEN, C. (2015). *Generation of chlorine by-products in simulated wash water*. Food Chemistry. pp. 97–102.

Silva, E.O. *et al.* (2011). *Processamento Mínimo de Produtos Hortofrutícolas*. Silva, I. C. P.; Vieira, S. L. V. (2017). *Alimentos minimamente processados: práticas de produção e riscos de contaminação*. Arquivos do Mudi, v. 21, n. 1, p. 26–38.

Simons, L. (2001). *New washing treatments for minimally processed vegetables*. 1. ed.: Horticultural Australia Ltd.

Smith, J., Daifas, D., El-Khoury, W., Koukoutsis, J., El-Khoury, A. (2004). *Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products – A Review*; Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44: 19-55.

Spencer, J., Spencer, A. (2001). *Methods in Biotechnology: Food Microbiology Protocols*, vol. 14; Totowa, New Jersey: Human Press.

Tiago, C. (2010). *Implementação de um sistema de gestão da qualidade e segurança alimentar segundo o global standard for food safety, numa empresa de embalagem e distribuição de frutos*.

Tese de Mestrado em Segurança Alimentar. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Varnam, A. e Sutherland, J. (1995). *Meat and meat products*. Technology, chemistry and microbiology. Food Products Series. Volume 3. London: Chapman & Hall. ISBN 0-412-49560-0. 430.

Vasconcelos, E.J.P. (2005). *Produtos minimamente processados*.

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

Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M.B., Seabra, M.J., Borges, M., Fernandes, P. e Nunes, S. (2012). *Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal*. Ministério da Economia e da Inovação, p. 330.

Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M. B., Seabra, M. J., Borges, M., Fernandes, P. e Nunes, S. (2009). «*Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal*». ASAE. Disponível em: <https://pt.scribd.com/doc/119468844/Perfil-deRisco-dos-Alimentos>.

Viegas, S.J. (2009). *Alteração do estado de saúde associadas à alimentação*. Available at: http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/AlimentacaoNutricao/Alimentacao_INSA_online.pdf.

World Health Organization. (WHO), (2009). *Shigella*. Disponível em: [http://www.who.int/topics/shigella/en/\(WHO technical report series; 916 ed.\)](http://www.who.int/topics/shigella/en/(WHO technical report series; 916 ed.)). Geneva, Switzerland: WHO Library.