

Mestrado em Segurança e Qualidade Alimentar na Restauração

Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril



Avaliação dos Fatores de Risco de Saladas Embaladas Prontas para Consumir

Filasmonique Laurinda de Moura

**Estoril, Portugal
2016**

Mestrado em Segurança e Qualidade Alimentar na Restauração

Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril



Avaliação dos Fatores de Risco de Saladas Embaladas Prontas para Consumir

Filasmonique Laurinda de Moura

Dissertação apresentada à Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril para obtenção do grau de Mestre em Segurança e Qualidade Alimentar na Restauração

Orientador: Professor Doutor Carlos Fernando Santiago Brandão
Coorientador: Professora Doutora Larissa Mont'Alverne Jucá Seabra

**Estoril, Portugal
2016**

*O que for a profundezza do teu ser, assim será teu desejo.
O que for o teu desejo, assim será tua vontade.
O que for a tua vontade, assim serão teus atos.
O que forem os teus atos, assim será o teu destino.*

Brihadaranyaka Upanishad IV, 4.5

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com o apoio e incentivo de diversas pessoas, sem as quais dificilmente teria se tornado uma realidade e a quem demonstro desde já a minha gratidão.

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor Carlos Brandão (Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril – ESHTTE, Portugal), o orientador desta dissertação, pelos conselhos e revisão deste trabalho; à Professora Doutora Larissa Mont'Alverne Jucá Seabra (Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Brasil), coorientadora, pelos seus ensinamentos e pelo apoio constante; ao professor António Fernandes pelo contributo na análise de dados; à Cátia Morgado pela paciência e por estar sempre disponível a ajudar; à Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril, que me disponibilizou o laboratório para a realização das análises.

À Abdenego Aires, por acreditar e investir no meu sonho, pelo incentivo e amizade e por me ensinar que se aprende em qualquer situação da vida. O importante é manter a “mente quieta, a coluna ereta e o coração tranquilo”.

O tempo tudo cura.

Aos familiares e amigos por compreenderem a distância e estarem sempre de braços abertos para me receber. Amo muito vocês.

A todos os meus colegas de mestrado que não nomeio mas que têm feito parte da minha caminhada, quero agradecer a simpatia, companhia e apoio, nos bons e maus momentos, manifestados ao longo destes anos.

Não foi fácil, mas é gratificante a realização de um sonho. Deixei o meu lugar de conforto, meu país, para levantar voo e seguir meus sonhos. E agora vejo que tudo valeu a pena: a saudade, o choro engolido, o choro chorado, o acolhimento recebido, as noites mal dormidas, os experimentos feitos e refeitos, o conhecimento compartilhado e acima de tudo o conhecimento adquirido.

A todos, o meu muito obrigada!

Filasmonique Moura

Índice Geral

Lista de Abreviaturas	viii
Resumo.....	x
Abstract	xi
1. Introdução Geral.....	1
2. Objetivos	5
2.1. Objetivos Gerais.....	5
2.2. Objetivos Específicos	5
3. Revisão Bibliográfica.....	6
3.1. Definições dos Produtos Minimamente Processados	6
3.2. Consumo e Comércio de Produtos Minimamente Processados no Mundo	7
3.3. Segurança Alimentar	8
3.3.1. Normas e Regulamentos de Segurança Alimentar.....	9
3.3.1.1 Codex Alimentarius.....	9
3.3.1.1.1 Boas Práticas	10
3.3.1.1.2. Normas Referentes aos Critérios Microbiológicos	10
3.4. Embalagens com Atmosfera Modificada.....	12
3.5. Controlo das Temperaturas dos Produtos e Equipamentos de Refrigeração	14
3.6. Microbiota Natural dos Alimentos.....	16
3.7. Epidemiologia	18
3.7.1. Contagem de Microrganismos a 30°C.....	19
3.7.2. <i>Enterobacteriaceae</i>	20
3.7.3. <i>Escherichia coli</i>	20
4. Materiais e Métodos.....	25
4.1. Pré-requisitos Associados ao Local de Exposição dos Produtos.....	25
4.1.1. Requisitos para Zona de Armazenamento a Frio	25
4.1.2. Controlo da Temperatura.....	26
4.2. Amostragem	26
4.2.1. Colheita e Envio	26
4.3. Avaliação Microbiológica.....	27
4.3.1. Preparação das Amostras.....	27
4.3.2. Contagens totais a 30°C	28
4.3.3. Pesquisa e contagem de Enterobactérias	28
4.3.4. Pesquisa e contagem de <i>Escherichia coli</i>	28
4.3.5. Pesquisa e contagem de Bolores e Leveduras	28
4.3.6. Pesquisa e contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.	29
4.4. Critérios de Classificação.....	29
4.5. Tratamento Estatístico	30
5. Resultados	32
5.1. Pré-requisitos Associados ao Local de Exposição dos Produtos.....	32
5.1.1. <i>Checklist</i>	32
5.1.2. Temperatura dos Equipamentos de Refrigeração dos VMP.....	33
5.1.3. Temperatura das Embalagens das Saladas Prontas para o Consumo	33
5.2. Análises Microbiológicas.....	34
5.3. Classificação das Amostras em Função do Parâmetro Microbiológico.....	35
5.4. Análise de Correlações	39
5.4.1. Correlação: Proximidade da Data de Consumo e a Quantificação de Microrganismos	39

5.4.2. Correlação: Temperatura das Embalagens e a Quantificação de Microrganismos	43
5.4.3. Comparações entre os Tipos de Amostras e a Quantificação de Microrganismos	46
6. Discussão	48
7. Conclusão	55
Referencias Bibliográficas	57

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais materiais de embalagens usados em MAP.....	13
Tabela 2 <i>Checklist</i> Temperaturas e Condições Higiénico-Sanitárias dos Expositores.....	26
Tabela 3 - Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a consumir.....	30
Tabela 4 - Condições de exposição de saladas prontas para consumo na grande Lisboa	32
Tabela 5 - Temperaturas dos Equipamentos de Refrigeração dos VMP.....	33
Tabela 6 - Temperaturas das Embalagens das Saladas Prontas para o Consumo	33
Tabela 7 – Análise Microbiológica das Saladas Prontas para o Consumo.....	34
Tabela 8 - Classificação e Avaliação da Qualidade Microbiológica das Saladas Embaladas Prontas para Consumo, Comercializadas em Lisboa.....	36
Tabela 9 - Diferenças entre os Tipos de Amostras e a Quantificação de Microrganismo.....	47

Índice de Figuras

Figura 1 - Classificação final da Avaliação da qualidade microbiológica das AmA..	38
Figura 2 - Classificação final da Avaliação da qualidade microbiológica das AmB..	38
Figura 3 - Classificação final da Avaliação da qualidade microbiológica de todas as amostras.	39
Figura 4 - Gráfico de Dispersão Contagens totais X Proximidade da Data de Consumo em Dias.....	40
Figura 5 - Gráfico de Dispersão Quantificação Enterobactérias X Proximidade da Data de Consumo em Dias.....	40
Figura 6 - Gráfico de Dispersão Quantificação de Bolores X Proximidade da Data de Consumo em Dias.....	41
Figura 7 - Gráfico de Dispersão Quantificação de Leveduras X Proximidade da Data de Consumo em Dias.....	42
Figura 8 - Gráfico de Dispersão Quantificação de <i>Pseudomonas</i> spp. X Proximidade da Data de Consumo em Dias.....	42
Figura 9 – Gráfico de Dispersão Temperatura das Embalagens X Contagens a 30°C Totais por Tipo de Amostra.....	43
Figura 10 - Gráfico de Dispersão Temperatura das Embalagens X Contagens de Enterobactérias por Tipo de Amostra.....	44
Figura 11 - Gráfico de Dispersão Temperatura das Embalagens X Contagens de Bolores por Tipo de Amostra.....	44
Figura 12 - Gráfico de Dispersão Temperatura das Embalagens X Contagens de Leveduras por Tipo de Amostra.....	45
Figura 13 - Gráfico de Dispersão Temperatura das Embalagens X Contagens de <i>Pseudomonas</i> spp. por Tipo de Amostra	45

Lista de Abreviaturas

AME	Alterações Microbiológicas e Enzimáticas
APT	Água Peptonada Tamponada
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
BIOHAZ	<i>Panel on Biological Hazards</i>
BPA	Boas Práticas Agrícolas
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i>
CAM	Contagem de Aeróbios Mesófilos
CCMVSP	Comité Científico das Medidas Veterinárias Relacionadas com a Saúde Pública
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DLC	Data Limite de Consumo
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESHTE	Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>
HUS	Síndrome Hemolítica Urémica
IFPA	<i>International Fresh-cut Produce Association</i>
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MAP	<i>Modified Atmosphere Packaging</i>
MP	Minimamente Processados
NP	Norma Portuguesa
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
SCF	<i>Scientific Committee on Food</i>

SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STEC	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>
TBX	<i>Tryptone Byle X-Glucuronide Agar</i>
UFC/g	Unidades Formadoras de Colónias por grama
VMP	Vegetais Minimamente Processados
VRGB	<i>Violet Red Bile Glucose Agar</i>
VTEC	<i>Verocytotoxin/ Verotoxinogénica</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Resumo

Produtos Minimamente Processados, “*fresh-cut*” e IV Gama são frutas e hortaliças, ou combinação dessas, que tenham sido fisicamente alteradas em sua forma original, isto é, descascadas, cortadas e embaladas, sendo oferecido ao consumidor um produto nutritivo e conveniente. A segurança e a qualidade microbiológica dos Vegetais Minimamente Processados - VMP têm sido motivo de preocupação nas últimas décadas devido ao aumento de associação com surtos de doenças de origem alimentar relacionados ao consumo de vegetais crus. Vegetais de folhas verdes parecem ser os produtos mais frequentemente envolvidos. O desafio é encontrar condições em que a proliferação microbiana e a degradação do vegetal sejam retardadas, para a manutenção da qualidade e o aumento do tempo de vida útil do produto. O objetivo deste trabalho foi avaliar os fatores de risco à saúde humana relativos ao consumo de saladas embaladas prontas para consumir. Analisamos um total de 45 amostras de saladas prontas para o consumo, embalagens que continham 1 tipo de vegetal (Alface tipo Iceberg), 3 (Alface escarola, alface *radicchio* e *canónigos*) e 4 tipos vegetais (Folha de ervilha, *red oak*, *canónigos* e cebolinho). Os expositores nos pontos de venda foram avaliados por meio de uma *checklist* (lista de verificação) e foram aferidas as temperaturas das embalagens dos produtos. Os resultados da avaliação microbiológica são os seguintes: Contagens totais a 30°C ($4,7 \times 10^4$ a $5,7 \times 10^8$ ufc/g), Enterobactérias ($9,0 \times 10^1$ - $8,9 \times 10^6$ ufc/g), *Escherichia coli* (< 10 ufc/g), Bolores (< 10 - $2,4 \times 10^3$ ufc/g), Leveduras (< 10 - $8,2 \times 10^4$ ufc/g), e *Pseudomonas* spp ($6,0 \times 10^4$ - $2,2 \times 10^8$ ufc/g). Em termos de pré-requisitos a maior parte dos equipamentos estavam em boas condições. Observou-se que 50% das amostras apresentavam temperaturas superiores de 7,8°C, acima dos limites considerados ideais (0 a 4°C). Foram classificadas como “Não satisfatório” 12,5% das amostras com 1 tipo de vegetal, 93,3% das amostras com 3 tipos de vegetais e todas as amostras com 4 tipos de vegetais. Estes resultados indicam que a qualidade microbiológica destes produtos necessita ser melhorada.

Palavras-chave: IV Gama, controlo microbiológico, saladas, minimamente processados, *fresh-cut*

Abstract

Minimally Processed Products, fresh-cut and IV Gama are fruits and vegetables, or combination of these, which have been physically altered in its original form, this is, peeled, cut and packaged, being offered to the consumer a nutritious and convenient product. The safety and microbiological quality of Minimally Processed Vegetables - VMP has been of concern in the last decades due to increased association with foodborne disease outbreaks related to consumption of raw vegetables. Green leafy vegetables seem to be the most frequently involved products. The challenge is to find conditions in which microbial proliferation and vegetable degradation is delayed, for the maintenance of the quality and increase of the useful life of the product. The objective of this study was to evaluate the risk factors to human health related to the consumption of packaged salads ready to eat. We analyzed a total of 45 samples of salads ready for consumption, packaging containing one type of vegetable (lettuce type Iceberg), 3 (endive lettuce, radicchio lettuce and canons) and 4 types vegetables (pea leaf, red oak, canons and chives). Exhibitors at the point of sale, were assessed through a checklist (checklist) and were measured the temperatures of the product packaging. The results of the microbiological evaluation were as follows: 30°C Total Counts ($4,7 \times 10^4$ to $5,7 \times 10^8$ ufc/g), *Enterobacteriaceae* ($9,0 \times 10^1$ to $8,9 \times 10^6$ ufc/g), *Escherichia coli* (<10 ufc/g), Molds (<10 to $2,4 \times 10^3$ ufc/g), Yeasts (<10 to $8,2 \times 10^4$ ufc/g) and *Pseudomonas* spp. ($6,0 \times 10^4$ to $2,2 \times 10^8$ ufc/g). In terms of prerequisites most of the equipment was in good condition. It was observed that 50% of the samples had higher temperatures 7,8°C above the limits considered ideal (0 to 4°C). Were classified as “Not satisfactory” 12.5% of the samples with 1 type of vegetable, 93.3% of the samples with 3 type of vegetable and all samples with 4 types of vegetable. These results indicate that the microbiological quality of these products need to be improved.

Keywords: IV Gama, microbiological control, salads, minimally processed, fresh-cut

1. Introdução Geral

As mudanças no padrão de consumo de alimentos no mundo ocidental são bastante perceptíveis quando comparado ao padrão de consumo da primeira metade do século XX. As mudanças ocorridas na sociedade, relacionadas com a globalização alteraram fortemente os hábitos alimentares. Anteriormente os alimentos consumidos eram produzidos e servidos no momento, estes tinham um baixo risco de contaminação e eram mais saudáveis (Santos & Campos Cunha, 2007).

A modernização durante o século passado resultou em urbanização juntamente com modificações no estilo de vida e de hábitos alimentares. Na mesma época, o desenvolvimento industrial tornou mais fácil cumprir os requisitos para alimentos processados (Pasha *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2014).

Atualmente as refeições não são sempre realizadas em casa, podendo o consumidor encontrar uma gama muito ampla de alternativas, por outro lado esses alimentos podem não ser uma alternativa saudável e muitas vezes esses produtos são muito ricos em energia e pobres em nutrientes. A influência da alimentação na saúde é inquestionável e é hoje universalmente aceite que frutas e vegetais são componentes essenciais de uma dieta saudável (Santos & Campos Cunha, 2007; Santos *et al.*, 2012; PAHO, 2016).

Frutas e vegetais são alimentos fundamentais na dieta humana e segundo o PAHO (2015), as orientações dietéticas emitidas pelo Ministério da Saúde do Brasil em 2014 a saber: “Os alimentos *in natura* ou Minimamente Processados (MP), em grande variedade e predominantemente de origem vegetal, são a base para uma alimentação nutricionalmente balanceada, saborosa, culturalmente apropriada e promotora de um sistema alimentar socialmente e ambientalmente sustentável”, poderiam ser usados como modelo (Ministério da Saúde, 2014).

A *World Health Organization* (WHO) e muitas autoridades de saúde em vários países, estimulam o consumo de 400g de legumes e frutas, o equivalente a 5 porções por dia para diminuir o número de doenças crônicas não transmissíveis em todo o mundo que causam por ano 2,7 milhões de mortes (WHO, 2003; Santos *et al.*, 2012).

As tendências de consumo crescente de vegetais crus por motivos nutricionais, aumenta a procura por alimentos prontos para consumo incentivando a indústria ao desenvolvimento de novas tecnologias para o processamento de alimentos. No entanto

os consumidores estão cada vez mais exigentes, os alimentos frescos são cada vez mais atraentes pois atendem as necessidades dos que buscam alimentos seguros, nutritivos, saudáveis, naturais, frescos, com alta qualidade e mais convenientes. Simplificando a preparações de refeições mais variadas (Rocha *et al.*, 2014).

Segundo a *International Fresh-cut Produce Association* (IFPA, 2015) Os termos minimamente processado, “*fresh-cut*” e IV Gama têm sido empregados para definir frutas e hortaliças, ou combinação desses, que tenham sido fisicamente alteradas em sua forma original, isto é, descascadas, cortadas em formato pronto para o consumo e embaladas, sendo oferecido ao consumidor um produto nutritivo e conveniente (IFPA, 2015). Logo, o processamento mínimo de frutas e hortaliças contribui para aumento da qualidade e padronização, embalagem de armazenamento fácil que ocupa pouco espaço e reduz desperdícios, além de possibilitar maior praticidade e economia de tempo no preparo diário de alimentos, cada vez mais necessários ao agitado mundo moderno. Além das vantagens citadas ao serem preparados num único local, o volume de lixo acumulado pode ser facilmente canalizado para outros fins, como por exemplo o fabrico/produção de ração animal (Rocha *et al.*, 2014).

Esta é uma tendência de consumo crescente mundial e Portugal não é exceção, uma vez que o mercado de Vegetais Minimamente Processados (VMP) atingiu 16 milhões de euros, constituindo 15% do total de vendas de produtos frescos em 2008 (Santos *et al.*, 2012).

Entretanto, os produtos IV Gama são mais perecíveis, uma vez que são submetidos a processos que causam alterações na estrutura física dos alimentos. Esses danos mecânicos aceleram o metabolismo, elevando a taxa respiratória (Picoli *et al.*, 2010; Jeddi *et al.*, 2014). Dessa forma, os microrganismos encontram condições para proliferar, sendo influenciados pelo metabolismo do tecido da planta e pela atmosfera modificada no interior da embalagem (Mahajan, Luca & Edelenbos, 2014). Este tipo de processamento favorece a contaminação de alimentos por microrganismos deteriorantes e patogênicos. A sobrevivência e crescimento de agentes patogênicos dependem de fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos, como a composição nutricional e a presença de substâncias anti-microbianas naturais, pH, textura, valor da atividade da água (*aw*), potencial redox, temperatura e atmosfera gasosa do alimento (SCF, 2002; Baptista & Venâncio, 2003). O desafio é encontrar condições em que a proliferação microbiana e a degradação do vegetal sejam retardadas, para a

manutenção da qualidade, aumento do tempo de vida útil do produto e para garantir a segurança e a aceitabilidade por parte dos consumidores (Mahajan, Luca & Edelenbos, 2014).

Para a garantia da vida útil dos produtos MP, é necessário um controlo rígido de temperatura e embalagem, higiene e desinfecção eficientes, bem como, deve haver uma preocupação na manutenção da qualidade dos produtos, com atenção ao sabor, ao aroma e ao valor nutricional (EMBRAPA, 2011).

A segurança e a qualidade microbiológica dos VMP tem sido motivo de preocupação nas últimas décadas devido ao aumento de associação com surtos de origem alimentar relacionados ao consumo de vegetais crus e os vegetais de folhas verdes parecem ser os produtos mais frequentemente envolvidos (Cardamone *et al.*, 2015).

A desinfecção corresponde à utilização de agentes químicos e métodos físicos inócuos para os alimentos e para a saúde humana para à redução do número de microrganismos. De acordo com Beuchat *et al.* (2001), o uso de soluções desinfetantes na água de lavagem dos produtos hortofrutícolas MP, tem a finalidade de reduzir a carga microbiana inicial, naturalmente presente nos alimentos. Um bom desinfetante deve ser efetivo a baixas concentrações e ter rápida atuação, por possuir um largo espectro de ação, ser solúvel em água, biodegradável, fácil de enxaguar, não corrosivo, inócuo e economicamente acessível (CDC, 2008). Dentre estes desinfetantes, destaca-se o cloro, comumente utilizado pelas empresas do sector alimentar devido à sua eficácia, fácil utilização e baixo custo (Olmez & Kretzchmar, 2009; Gil *et al.*, 2015).

Tendo em vista que o processo de desinfecção apresenta limitações na redução da carga microbiana, principalmente em produtos com alto nível de contaminações microbiológicas, este é mais um motivo para que os processadores selecionem matérias-primas com baixo nível de contaminação microbiana, especialmente por psicotróficos, que são microrganismos que se desenvolvem em temperaturas de refrigeração (EMBRAPA, 2011, p. 12-13).

O controle deficiente da temperatura em todas as etapas do processo, do não uso da tecnologia de atmosfera gasosa modificada nas embalagens e da não implementação de ferramentas de qualidade, tais como as Boas Práticas Agrícolas e

de Fabricação (BPA e BPF), são fatores importantes na indústria de processamento mínimo podendo ser a causa de muitos problemas tecnológicos (Gil *et al.*, 2015).

A senescência ocorre principalmente em vegetais folhosos, produtos que têm uma taxa de respiração muito elevadas e são sensíveis ao etileno. Deve-se ter o cuidado para não armazenar produtos com liberação de gases, odores e temperaturas incompatíveis no mesmo ambiente de armazenamento (EMBRAPA, 2011).

Para o desenvolvimento desse estudo além de avaliar qualitativamente e quantitativamente a conformidade dos critérios microbiológicos das saladas prontas para o consumo, analisaremos se o desenvolvimento microbiológico é semelhante em embalagens que contenham um ou vários tipos de vegetais. Será analisado também se os pré-requisitos associados ao local de exposição dos produtos estão adequados de forma a garantir a qualidade dos alimentos e segurança do consumidor.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

- ❖ Avaliar as condições higiênico-sanitárias de saladas embaladas prontas para o consumo.

2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Levantamento bibliográfico sobre a importância epidemiológica e do controle de qualidade dos produtos minimamente processados;
- ❖ Avaliação de pré-requisitos associados a exposição dos produtos;
- ❖ Avaliação qualitativa e quantitativa microbiológica geral em conformidade com critérios microbiológicos.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Definições dos Produtos Minimamente Processados

A necessidade de armazenar alimentos por períodos mais prolongados, fez com que o homem desenvolvesse técnicas de conservação. Esses processos trazem vantagens e desvantagens: se por um lado, conseguiam manter os alimentos por muito mais tempo inibindo o crescimento microbiano, por outro, as alterações provocadas eram muito grandes. A salga e a secagem da carne ou do pescado, a produção de conservas de frutas evaporando a água e adicionando o açúcar, a coagulação e secagem do leite para obter queijo, a fermentação dos leites ou dos sumos para obter iogurte ou bebidas alcoólicas são exemplos. Estes processos alteravam essencialmente as características dos produtos e destruíam micronutrientes, para além dos inconvenientes da adição exagerada de açúcar e sal (Sousa & Alves, 2008).

Hoje existe a produção de alimentos em larga escala e eles podem ser comercializados de diversas formas, quer *in natura*, quer sujeitos a uma preparação prévia seguida de transformação. Assim, relativamente ao processamento efetuado, são designadas cinco “gamas” de produtos. Os produtos da 1ª Gama, são os alimentos naturais sem tratamento; 2ª Gama são produtos congelados que têm a conveniência de se conservar por períodos longos, mantendo as características semelhantes das originais; 3ª Gama ou produtos enlatados/em conserva, que são produtos cozinhados e esterilizados na própria embalagem, prontos a consumir e conservados à temperatura ambiente por períodos de tempo muito longos (superiores a um ano). Os hortofrutícolas de 1ª gama deram origem a produtos de 4ª gama ao serem escolhidos, lavados/desinfectados, cortados e acondicionados em atmosfera modificada para aumentar o tempo de vida dos produtos frescos ou MP. Por fim, a 5ª gama refere-se aos alimentos pré-cozinhados, submetidos a calor através da cozedura, pasteurização ou esterilização e que, a partir de diferentes ingredientes, constituem um prato pronto para consumir (Sousa & Alves, 2008).

O foco deste trabalho é dado aos alimentos 4ª Gama, também conhecidos como MP e *Fresh-cut*, estes correspondem a alimentos *in natura* que foram submetidos a processos de limpeza, retirada de partes não comestíveis ou indesejáveis, fracionamento, moagem, secagem, fermentação, pasteurização, refrigeração, congelamento e processos similares que não envolvam adição de sal,

açúcar, óleos, gorduras ou outras substâncias ao alimento original (Ministério da Saúde, 2014; IFPA, 2015).

Os produtos MP vêm obtendo uma crescente participação no mercado de produtos frescos desde a sua introdução nos EUA nos anos 1970 e na França no início dos anos 1980. No Brasil, a utilização desta forma de consumo começou no princípio da década de 90. Nos últimos anos esse tipo de mercado tem apresentado uma evolução significativa nas vendas, principalmente pela expansão dos serviços de comida rápida (restaurantes, hotéis e serviços de *caterings*) e a nível doméstico (EMBRAPA, 2011).

3.2. Consumo e Comércio de Produtos Minimamente Processados no Mundo

As preferências dos consumidores estão mudando, e mudando drasticamente, segundo a *Nacional Grocers Association* (NGA, 2015) que realizou um painel nacional (EUA) de consumidores on-line entre outubro e novembro de 2014. Ao todo, 902 compradores domésticos completaram um questionário que detalharam suas experiências, comportamentos e sentimentos sobre o que agrada a eles (ou não) com respeito aos supermercados, bem como suas influências de compra, hábitos alimentares e preocupações nutricionais. 129 atributos comerciais foram analisados; 50% dos participantes disseram que sua dieta pode ser mais saudável; 28% optam pelos alimentos MP e 25% querem uma lista mais curta de ingredientes.

De acordo com a *Annual Food & Health* na pesquisa do *International Food Information Council* (IFIC) também informou que 36% dos compradores disseram se preocupar com produtos químicos em seus alimentos, e que os alimentos rotulados com algum atributo à saúde teve um aumento de vendas de 13% no último ano, contra vendas mais ou menos planas em toda a loja. Como os consumidores estão ativamente a tentar viver estilos de vida mais saudáveis, os operadores da indústria e retalhista de alimentos estão sendo forçados a adaptar os seus produtos e serviços para atender a esse crescimento da demanda global e o novo consumidor do século 21 (Duff & Phelps, 2016).

A indústria de transformação global de frutas e vegetais tem experimentado demanda consistente ao longo dos últimos cinco anos até 2016. O crescimento da renda per capita mundial têm estimulado o crescimento da demanda global por alimentos. A receita da indústria de MP deverá crescer a uma taxa anual de 3,0% ao

longo dos próximos cinco anos até 2021, chegando a 317,1 bilhões de dólares. A maior parte do processamento de frutas e vegetais é feito atualmente na América do Norte e Europa (IBIS World, 2016).

De acordo com a IBIS *World - Industry Market Research International* (2016) em 2015 a Europa foi a região global que produz a maior parte dos produtos da indústria, em um número estimado de 42,3% do total global. Frutas e vegetais têm sido produzidos em massa para alimentar a população densa e altamente urbanizada desta região. A região também é lar de uma série de processadores de frutas e vegetais de médio porte. O processamento de frutas e vegetais é feito em quantidades elevadas em todo o continente, mas uma concentração relativamente mais elevada de operações da indústria ocorre em maiores economias do continente, incluindo a Alemanha, Rússia, Itália, França e Reino Unido.

O Norte da Ásia com 20,1% detém o segundo lugar no *ranking* mundial de processamento de frutas e legumes. A América do Norte (11,5%) é o terceiro maior fabricante de frutas e legumes processados do mundo, tendo os Estados Unidos de longe, o papel mais importante na produção da indústria, mais de metade das frutas e legumes frescos são processados. América do Sul é o quarto maior fabricante de frutas e legumes processados, e é estimada em 9,0% da produção global. Dada a sua grande base de consumidores e produção substancial de frutas e vegetais frescos, o Brasil é de longe o maior fabricante de frutas e vegetais processados no continente (IBIS World, 2016).

3.3. Segurança Alimentar

A segurança sanitária dos alimentos tem sido tema pertinente não apenas em estudos científicos, como também nas questões de ordem político-econômica dos países em todo o mundo. Em razão do crescente número de casos de surtos de doenças e da importância desse fator no comércio internacional de alimentos, a segurança dos alimentos tem focado atenções em alternativas mais eficientes para controle e garantia da inocuidade dos alimentos, especialmente na eliminação de microrganismos patogênicos da cadeia alimentar (EMBRAPA, 2006).

3.3.1. Normas e Regulamentos de Segurança Alimentar

Segundo o Regulamento n.º 2073/2005 da Comissão das Comunidades Europeias, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, os alimentos prontos para consumo são “alimentos destinados pelo produtor ou fabricante ao consumo humano direto, sem necessidade de cozedura ou outra transformação, eficaz à eliminação ou à redução a um nível aceitável os microrganismos perigosos” (Regulamento (CE) n.º 2073/2005).

As normas e regulamentos alimentares dizem respeito a todas as fases da produção alimentar desde a armazenagem até o consumidor final, tanto a nível nacional como a nível internacional, é importante que toda a cadeia de produção seja mantida segura, com produtos de boa qualidade e apropriados para consumo.

A implementação da Segurança Alimentar envolve uma complexa mistura de Leis, normas e boas práticas aceites, envolvendo Governos, Organizações Internacionais, Organizações de Indústrias, Agências de Investigação, Organismos de Independentes e Organismos de Certificação Independentes (Rentokil, 2016).

3.3.1.1 *Codex Alimentarius*

O ponto de referência global para produtores, processadores, consumidores, agências de segurança alimentar nacionais e o comércio internacional de alimentos é o *Codex Alimentarius*, elaborado inicialmente pela FAO e pela WHO em 1961, e gerido pela Comissão do *Codex Alimentarius* (CAC/RCP 1, 1969/ Rev. 4, 2003).

O *Codex* tornou-se o controlador global para a harmonização das práticas e padrões entre os organismos nacionais, para a segurança e qualidade alimentar e também do comércio internacional. Com frequência, as preocupações públicas relativas as questões de inocuidade dos alimentos situam o *Codex Alimentarius* como centro de debates mundiais (FAO, 2016).

O *Codex Alimentarius* estimulou países a introduzir uma nova Legislação Alimentar e contribui, através de suas normas, orientações e códigos de práticas internacionais de alimentos para a segurança, qualidade e equidade no comércio internacional de alimentos. Os consumidores podem ter a certeza de que os produtos alimentares que compram são seguros e de importadores de qualidade. As normas do *Codex* baseiam-se na melhor informação científica disponível, apoiados por

organismos de avaliação internacional de risco independentes ou consultas especiais organizadas pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) e pela WHO (*World Health Organization*) (FAO, 2016).

O *Codex Alimentarius* estabelece os princípios de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP). O sistema HACCP é um processo sistemático e cientificamente fundamentado, pensado para incorporar os processos de produção, transformação e comercialização de alimentos, é definido como as atividades e condições básicas necessárias para manter um ambiente higiênico ao longo da cadeia alimentar, apropriado à produção, ao manuseamento e ao fornecimento de géneros alimentícios seguros para o consumo humano (ISO 22000, 2005).

Antes de aplicar o sistema HACCP a qualquer sector da cadeia alimentar, o *Codex Alimentarius* recomenda a adoção das Boas Práticas. Este programa é pré-requisito para implementação HACCP (CAC/RCP 1, 1969/ Rev. 4, 2003).

3.3.1.1.1 Boas Práticas

As Boas Práticas Agrícolas (BPA) e as Boas Práticas de Fabricação (BPF), foram criadas para tornar os sistemas de produção mais eficientes e rentáveis, além de assegurar ao mercado consumidor o fornecimento de alimentos seguros, produzidos de forma sustentável. As BPA e BPF são um conjunto de requisitos, normas e recomendações técnicas, aplicáveis à produção agrícola, envolvendo todas as atividades realizadas no campo e após a colheita voltados para o ambiente, aos colaboradores e para as operações de produção primária e processamento mínimo. Como os controlos são realizados em cada etapa, o resultado final é de um produto com qualidade garantida (CAC/RCP 53, 2003; Gil *et al.*, 2015).

3.3.1.1.2. Normas Referentes aos Critérios Microbiológicos

Na União Europeia, a Indústria de Alimentos e Bebidas é o maior sector de produção em termos de emprego e valor agregado. A UE confirma a sua posição na liderança mundial como exportador agroalimentar. As exportações de produtos agroalimentares atingiram 129 mil milhões de euros em 2015 (European Commission, 2016). Todas as medidas Nacionais e da UE são guiadas pelos princípios gerais alimentares da Lei descrita na Regulamentação Geral da Alimentação (CE) 178/2002.

Os objetivos gerais da Legislação Alimentar Europeia (CE) 178/2002 são:

- Determinar os princípios e normas gerais da legislação alimentar, criar a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. Esses objetivos visam:
- Garantir um elevado nível de proteção da vida Humana e da saúde e da proteção dos interesses dos consumidores;
- Garantir práticas justas no comércio de produtos alimentares, tendo em conta a saúde e bem-estar animal, saúde da flora e da fauna;
- Garantir a livre circulação de alimentos e rações fabricadas e comercializadas na União Europeia;
- Facilitar o comércio global de segurança alimentar e de alimentos seguros e saudáveis tendo em conta as normas e acordos internacionais (Rentokil, 2016).

O Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, estabelece regras nos termos do disposto no artigo 4.º do Regulamento (CE) n.º 852/2004, os operadores das empresas do sector alimentar devem respeitar critérios microbiológicos. Para esse efeito, devem efetuar testes relativamente aos valores fixados para os critérios, mediante a colheita de amostras, a realização de análises e a aplicação de medidas corretivas, em conformidade com a legislação alimentar e as instruções dadas pelas autoridades competentes. As medidas a tomar pelos operadores das empresas do sector alimentar a fim de garantir o cumprimento de critérios que definam a aceitabilidade de um processo podem incluir, entre outras, o controlo das matérias-primas, da higiene, da temperatura e do período de vida útil do produto.

Em 21 e 22 de Janeiro de 2003, o Comité Científico das Medidas Veterinárias Relacionadas com a Saúde Pública de Portugal (CCMVSP) emitiu um parecer sobre a *E. coli* verotoxinogénica (VTEC) nos géneros alimentícios, no qual concluiu ser pouco provável que a aplicação de um padrão bacteriológico nos produtos finais para a VTEC O157 produza efeitos significativos em termos de redução do risco para os consumidores. Todavia, a definição de diretrizes microbiológicas tendo em vista a diminuição da contaminação fecal ao longo da cadeia alimentar pode contribuir para a redução dos riscos para a saúde pública, incluindo os associados à VTEC.

O produtor ou fabricante de um produto alimentar deve decidir se o produto está pronto para ser consumido enquanto tal, sem necessidade de ser cozinhado ou submetido a outra transformação para garantir a sua segurança e o cumprimento dos critérios microbiológicos. Nos termos do artigo 3.º da Diretiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Março de 2000, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios, é obrigatório indicar na rotulagem dos géneros alimentícios o respectivo modo de emprego, quando a sua omissão não permitir fazer uma utilização adequada do género alimentício. Ao decidir das frequências de amostragem para a realização de testes baseados nos critérios microbiológicos, os operadores das empresas do sector alimentar devem ter em conta esse modo de emprego.

Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, este menciona que os valores de referência têm sofrido algumas alterações resultantes de pareceres do painel Científico dos Riscos Biológicos da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos.

Este mesmo regulamento indica se o processo de produção funciona de modo aceitável e estabelece um valor de contaminação indicativo, acima do qual se tornam necessárias medidas corretivas para preservar a higiene do processo em conformidade com a legislação alimentar (não é aplicável aos produtos colocados no mercado). A legislação comunitária define critérios microbiológicos de segurança e higiene dos processos. O Regulamento n.º 1086/2011 define a aceitabilidade de um produto ou de um lote de produtos colocados no mercado.

3.4. Embalagens com Atmosfera Modificada

O processo conhecido por *Modified Atmosphere Packaging* (MAP) significa embalagem em atmosfera modificada. O uso de atmosfera modificada controlada envolvendo os alimentos (também chamada atmosfera protetora), constitui uma barreira para desenvolvimento de flora remanescente, mantendo a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos estendendo a vida útil e retardando o processo de deterioração, facilitando a comercialização dos diferentes produtos (Lidon & Silvestre, 2010).

A atmosfera modificada no interior das embalagens consiste numa mistura de gases que está para cada alimento, de modo a preservar as suas qualidades durante mais tempo (Santos & Oliveira, 2012). Deve-se entender que este processo não melhora a qualidade dos alimentos, apenas retarda as Alterações Microbiológicas e Enzimáticas (AME), pelo que a qualidade da matéria-prima é essencial (Sousa & Alves, 2008).

A mistura de gases ideal vai depender de vários fatores, como o tipo de alimento, a microbiota presente e o principal mecanismo de deterioração do alimento. Alimentos que não respiram, como produtos cárneos, devem ser embalados com filmes de baixa permeabilidade aos gases, enquanto os que respiram, como frutas e vegetais, devem ser embalados com filmes que possibilitem a troca gasosa (Mantilla, *et al.*, 2010).

São muitos os materiais de embalagem existentes para estes fins, e a escolha de um sistema de embalagens depende da fisiologia do produto, do mercado, da tecnologia de processamento adotada e da expectativa de vida útil esperada do produto pronto (Sousa & Alves, 2008). Na tabela 1 temos os principais materiais de embalagens usados em MAP e suas características.

Tabela 1 - Principais materiais de embalagens usados em MAP

ABREVIATURA	DESIGNAÇÃO	FUNÇÃO
PA	Poliamida	Resistência a elevadas temperaturas, flexibilidade, dureza, alguma barreira ao gás
OPA	Poliamida orientada	Barreira ao gás
LDPE	Polietileno de baixa densidade	Soldadura
EVOH	Copolímero de etileno e álcool vinílico	Barreira ao gás
PVdC	Cloreto de polivinilideno (Saran)	Barreira ao gás, barreira à humidade
PET	Poliéster	Rigidez, alguma barreira ao gás
OPET	Poliéster orientado	Resistência a elevadas temperaturas, flexibilidade
EPS	Poliestireno expandido	Rigidez
PP	Polipropileno	Barreira à humidade, rigidez, compatível com o microondas
OPP	Polipropileno orientado	Barreira à humidade, flexibilidade
PVC	Policloreto de vinilo	Rigidez, barreira ao gás

Fonte: Sousa & Alves, 2008.

Acondicionar os alimentos em MAP não é suficiente para garantir a segurança alimentar do produto, esse processo deve ser visto como mais uma barreira ao desenvolvimento microbiano e à atividade enzimática, devendo ser conjugado com

outros factores importantes à conservação, como, atividade da água (a_w), pH e temperatura (Sousa & Alves, 2008).

3.5. Controlo das Temperaturas dos Produtos e Equipamentos de Refrigeração

Os produtos hortícolas (frutas e hortalças) possuem elevada perecibilidade quando ocorre um manuseio inadequado durante a colheita, transporte e comercialização (Lidon & Silvestre, 2010). Estas continuam seus processos fisiológicos, passando por mudanças físicas mesmo após a colheita, e já não pode repor as suas reservas nutricionais e de água, pelo que sofre um envelhecimento que é seguido de apodrecimento. Essas mudanças são em grande parte resultado do processo de respiração (Campbell-Platt, 2015).

Os frutos e vegetais frescos pré-cortadas devem ser mantidos a baixas temperaturas em todas as fases, de corte por meio de distribuição, a fim de minimizar o crescimento microbiológico (CAC/RCP 53, 2003; Gil *et al.*, 2015).

A taxa de respiração dos tecidos vegetais aumenta exponencialmente com o aumento da temperatura. O controle da temperatura nos níveis recomendados após a embalagem, durante a distribuição, transporte, armazenamento, comercialização, ou antes de serem consumidas é essencial para manter a qualidade e vida útil das frutas e hortalças minimamente processadas (EMBRAPA, 2011). Um dos principais problemas associados com VMP é a possibilidade de abuso de temperatura na cadeia de processamento, quando isso ocorre, existe um potencial para proliferação rápida de organismos mesófilos, que apresentam taxa de crescimento pronunciada a 12°C, resultando na deterioração precoce do produto (Rocha *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2010).

O controle das etapas de processamento, a manutenção das temperaturas na cadeia de frios das indústrias até as estantes refrigeradas dos supermercados, têm sido citados como aspectos importantes para prevenir as perdas de qualidade e as toxinfecções alimentares cada vez mais frequentes. Estes controlos rigorosos não apenas favorecem a qualidade sensorial das frutas e hortalças minimamente processadas, mas também ajudam a minimizar os riscos microbiológicos (Alves *et al.*, 2010; FAO, 2010; EFSA, 2014).

Os principais fatores de controle para a conservação dos alimentos são métodos cujo principal objetivo é a inibição da alteração microbiana, sem prejudicar a

sua qualidade. Assim recorre-se a: temperaturas baixas, para retardar o desenvolvimento microbiano; temperaturas elevadas, para destruir os microrganismos; desidratação; abaixamento do valor do pH; aditivos químicos com funções conservantes; atmosfera controlada (redução do oxigênio disponível e aumento do dióxido de carbono); e irradiação (Lidon e Silvestre, 2010).

O controlo adequado da temperatura, associado ao processo de desinfecção, é importante para reduzir o risco de contaminação microbiana e potencial de crescimento subsequente sendo fundamental na disponibilização de produtos seguros e de qualidade ao consumidor (EMBRAPA, 2011). Entretanto, esses fatores não garantem um produto livre de agentes patogénicos (USDA, 2016).

A maioria das recomendações de temperatura atual para alimentos inteiros e produtos MP são baseadas em temperaturas que mantêm os atributos de qualidade. A temperatura é provavelmente, a variável mais importante, uma vez que a sua manipulação imprópria provoca alterações evidentes nas características sensoriais dos produtos hortícolas frescos que influencia na aceitação do consumidor (Moreira *et al.*, 2006).

Quando produtos forem estivados, estes não devem ser postos em quantidades excessivas nem devem obstruir passagem de ar, mantendo a boa circulação de ar frio nos equipamentos, para evitar que os produtos se exponham a temperaturas elevadas. Idealmente, a faixa de temperatura indicada para as câmaras de armazenamento varia de 0 à 2°C (USDA, 2016). No entanto, sabe-se que no supermercado, a temperatura dos equipamentos de refrigeração varia muito, podendo oscilar de 5°C à 12°C, dependendo da eficácia dos equipamentos e do manuseio dos produtos (EMBRAPA, 2011).

Os equipamentos de refrigeração (veículos de transporte, locais de armazenamento) devem ter dispositivos de medição de temperatura precisos, calibrados que devem ser calibrados e monitorados regularmente (CFIA, 2014).

O controlo subsequente do produto acabado ao longo da sua vida de prateleira também é de fundamental importância para minimizar o crescimento de microrganismos patogénicos. No que diz respeito à temperatura de transporte e conservação do produto acabado, estes devem ser armazenados a temperaturas de refrigeração que deverá ser de 0°C à 4°C (CFIA, 2014). A Autoridade de Segurança Alimentar e Económica de Portugal (ASAE) recomenda que os equipamentos de refrigeração estejam a cerca de 4°C (ASAE, 2016).

Alguns fatores importantes devem ser considerados nos equipamentos de refrigeração para manter os produtos em temperatura a níveis seguros: manutenção das câmaras para evitar refrigeração de ar forçado e possível contaminação dos produtos; os equipamentos devem ser limpos e desinfectados tendo em atenção o acumulo de gelo; as prateleiras devem estar em bom estado de conservação; os produtos devem estar protegidos das zonas de aquecimento da unidade de refrigeração (por exemplo, perto da porta ou proximidade da área externa, se tratando de câmaras abertas) e por fim as mercadorias devem ser armazenadas sempre com produtos semelhantes (produto não processado ao lado de produtos não transformados e produtos acabados próximo ao produto acabado) para evitar a contaminação cruzada (FDA, 2013; USDA, 2016).

Quando utilizado atmosfera modificada nas embalagens, estas devem conter informações claramente especificadas quanto a data ou o dia em que deve ser consumida ou descartados, com base nas combinações temperatura e tempo praticadas no local de venda (exemplo se mantidas à $\leq 5^{\circ}\text{C}$ podem ser mantidas por um período máximo de 7 dias; ou 7°C ou entre 5°C e 7°C durante um máximo de 4 dias). Ou seja, quanto mais exposto os produtos são a temperaturas elevadas, menor tempo de prateleira eles terão (FDA, 2013).

Com o aumento excessivo da temperatura, a taxa de respiração dos vegetais aumenta mais que a taxa de permeabilidade a gases dos materiais da embalagem, desfazendo a atmosfera que foi otimizada para a conservação do produto. Existem casos críticos onde todo o oxigênio é consumido, ocorre anaerobiose (ausência de oxigênio), o que possibilita o processo de fermentação e o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, representando um risco à saúde do consumidor (EMBRAPA, 2011). Combinações de alimentos dentro da mesma embalagem tendem a reduzir o tempo de prateleira dos produtos (FDA, 2013).

3.6. Microbiota Natural dos Alimentos

Todos os alimentos apresentam uma microbiota natural extremamente variável, concentrada principalmente na região superficial, o número de microrganismos pode variar entre 10^4 a 10^9 UFC/g (Lidon & Silvestre, 2010). A microbiota de MP é sobretudo de origem telúrica, mas também do ambiente em que são manipuladas, esta caracteriza-se pela presença de *Pseudomonas spp.*, *Erwinia*

herbicola e *Enterobacter agglomerans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus spp.* e leveduras, normalmente estes microrganismos não são patogênicos para o ser humano. Geralmente cerca de 50% a 90% das bactérias que se encontram na superfície das plantas são Gram-negativas e pertencem ao grupo das *Pseudomonas* ou das *Enterobacteriaceae* (SCF, 2002). Além da microbiota não patogênica, existe a microbiota patogênica, dentre elas estão, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Listeria monocytogenes* (Issa-Zacharia *et al.*, 2010). Os tecidos internos dos vegetais, por seu lado, são normalmente considerados estéreis (SCF, 2002).

Paralelamente à microbiota natural, as diversas etapas de processamento de alimentos estão sujeitas à contaminação por diferentes microrganismos, estes denominamos de fatores extrínsecos que são provenientes de uma manipulação inadequada; contato com equipamentos, superfícies e utensílios; e pela atmosfera ambiental. Neste contexto, as espécies ou grupos de microrganismos predominantes no alimento dependem, fundamentalmente, das características inerentes a esse alimento, e das condições ambientais prevalentes (Lidon & Silvestre, 2010).

Os fatores intrínsecos que favorecem multiplicação ou inibição de microrganismos são: a atividade de água (a_w), o potencial hidrogeniônico e potencial de oxidação-redução, também, a temperatura, umidade relativa e a composição da atmosfera que envolve os alimentos (Lidon & Silvestre, 2010).

Microrganismos de deterioração são produtores de compostos voláteis durante seu metabolismo, causando características sensoriais desagradáveis, eles são capazes de degradar os alimentos, geralmente, não causam toxinfecções, mas os alimentos se apresentam com qualidade indesejável para o consumidor. Os microrganismos de deterioração mais encontrados em frutas e vegetais minimamente processadas são: *Pseudomonas spp.*, *Erwinia herbícola*, *Enterobacter agglomerans* e as bactérias do ácido láctico, tais como: *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus spp.*, bolores, leveduras, alguns vírus e parasitas. Entretanto deteriorantes, bolores e leveduras são dominantes (EMBRAPA, 2006).

Embora as bactérias, fungos e leveduras possam ocorrer nos alimentos na grande maioria das situações, as bactérias geralmente predominam porque: apresentam um tempo de geração muito reduzido; podem utilizar uma diversidade de substratos; revelam uma larga variação de comportamento e dos diferentes gêneros (face a fatores ambientais emergentes) (Lidon & Silvestre, 2010).

Os produtos hortofrutícolas geralmente não estão associados a surtos e toxinfecções alimentares tanto quanto produtos de origem animal e transmitem ao consumidor uma imagem de alimentos seguros. Porém as frutas e hortaliças minimamente processadas têm sido relatados como veículos de surtos alimentares (SCF, 2002; Hanson *et al.*, 2012).

3.7. Epidemiologia

Surtos de doenças transmitidas por alimentos associados ao consumo de produtos frescos MP estão aumentando simultaneamente com o aumento na frequência de consumo (Cardamone *et al.*, 2015). A presença destes microrganismos nestes produtos alerta para a necessidade de um maior controle da produção, desde o campo até a mesa dos consumidores (Gil *et al.*, 2015).

O principal problema na pós colheita que faz com que vegetais seja altamente perecíveis é a facilidade de crescimento microbiano. Infelizmente, tem sido demonstrado que atuais tratamentos de lavagem e desinfecção industriais não garantem a eliminação total de agentes patogénicos quando presente (Abadias *et al.*, 2011; Food Safety Whatch, 2016).

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2011), as bactérias patogénicas são contaminantes de vegetais frescos se estas estão presentes nos VMP podem causar danos a saúde do consumidor (inclusive serem mortais), dependendo do nível de contaminação.

Também presença de bactérias indicadoras em alimentos MP, embora não seja inerentemente a um perigo, pode ser indicativo da prática deficiente, como: má qualidade das matérias-primas ou componentes alimentares; pouca cocção; contaminação cruzada; limpeza deficiente; deficiente controle de temperatura e tempo (Health Protection Agency, 2009).

As bactérias indicadoras podem estar associadas com um aumento da probabilidade da presença de agentes patogénicos, bem como a possível fonte de contaminação, de origem fecal, e nos indicam se as condições sanitárias foram inadequadas durante o processamento. Os organismos indicadores são úteis na avaliação da segurança do produto alimentar porque elas 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 níveis limítrofes de indicadores deve-se pedir uma investigação mais aprofundada (Health Protection Agency, 2009).

3.7.1. Contagem de Microrganismos a 30°C

As contagens de microrganismos a 30°C, também conhecida como a contagens totais viáveis ou contagem de aeróbios mesófilos (CAM), não contribuem diretamente para a avaliação da segurança de alimentos prontos-a-comer, eles são indicadores da qualidade e validade dos vegetais prontos para consumo, uma vez que estes microrganismos são responsáveis pela sua deterioração (SCF, 2002; Food Safety Whatch, 2009).

As contagens elevadas pode sugerir problemas de qualidade deste parâmetro 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.

Os microrganismos são inevitavelmente introduzido durante processamento (corte, embalagem, porcionamento e outras manipulações), mas isso deve ser minimizado através das Boas Práticas de Fabricação. O tipo de embalagem pode então influenciar a taxa de crescimento microbiano, por exemplo embalagem de vácuo irá retardar o crescimento de organismos aeróbios obrigatórios devido à exclusão de oxigénio. A temperatura de refrigeração para produtos estáveis também influencia na taxa de crescimento microbiano; armazenagem 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 psicotróficas*; uma temperatura de refrigeração mais baixa irá reduzir a taxa de crescimento adicional e ajudam a prolongar a vida de prateleira. Como o tempo de armazenamento aumenta o número de colónias aeróbias também aumenta; isto também ocorrerá se temperaturas de refrigeração são mal controladas ou se o alimento é frequentemente retirado da refrigeração (Food Safety Whatch, 2009).

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 irá depender de qual o tipo de organismo predomina (Food Safety Whatch, 2009).

Para alimentos crus, prontos para comer, tais como vegetais, as contagens totais são susceptíveis de serem muito mais elevadas, entre 10^6 e 10^8 ufc/g. Isto tenderá a limitar o seu período de vida como a deterioração pode ocorrer de forma relativamente rápida e geralmente será visível. Isto também se aplica aos produtos, comercializados prontos para o consumo como saladas, arroz ou macarrão com vegetais crus (Food Safety Whatch, 2009).

3.7.2. *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* é um grupo de bactérias que é utilizada para avaliar o estado geral de higiene de um produto alimentar, são os agentes mais frequentemente encontrados, poderiam ser utilizadas como indicador do risco. Este grupo inclui as espécies que originam a partir do trato intestinal de seres humanos e animais, bem como as plantas e o ambiente. Todas *Enterobacteriaceae* são destruídas pelo processamento térmicos utilizados na produção de alimentos. A sua presença em alimentos submetidos a tratamento térmico, significa cocção inadequada ou contaminação pós-processamento. Altos níveis destas bactérias podem ocorrer em alguns produtos alimentares, tais como hortaliças. O uso de desinfectantes pode reduzir, mas não eliminar totalmente estes organismos (Health Protection Agency, 2009; Gil *et al.*, 2009).

A *European Food Safety Authority* (EFSA) recomendou a monitorização e 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 detecção de agentes patogénicos específicos (Regulamento (CE) n.º 2073, 2005).

3.7.3. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (*E. coli*) pertence à família *Enterobacteriaceae* e é utilizado como um indicador fecal para avaliar o estado de higiene de um produto alimentar. A *E. coli* são destruídas pelos processos térmicos utilizados na produção de alimentos e deve ser facilmente removida da indústria de alimentos, equipamento e as superfícies por meio de procedimentos de limpeza adequados (Rajwar *et al.*, 2015).

A *Escherichia coli* O157:H7 foi reconhecida pela primeira vez como um agente patogénico em 1982 sendo aí reconhecida como potencial problema de saúde pública. A maioria dos surtos infecciosos por *E. coli* enterohemorrágica é causada por estirpes O157:H7 (Lopes *et al.*, 2012). Esta estirpe é considerada a principal causa de colite hemorrágica e da Síndrome Hemolítica Urémica (HUS), esta síndrome é caracterizada por falência renal aguda, anemia hemolítica e trombocitopenia (baixo número de plaquetas no sangue). Estima-se que cerca de 10% dos pacientes com *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) possa desenvolver HUS. Recentemente, dois surtos graves de *E. coli* O157:H7 infeções ligadas ao consumo de legumes pré-embalados (Folhas verdes e alface) afetou muitas pessoas em vários estados da EUA (CDC, 2012). Ainda, em 2011, houve um surto com a toxina produzida pela *E. coli* (*Shiga* toxina O104) que infectou quase 4.000 pessoas na Europa e causou a morte de 46 deles; autoridades sugeriram que brotos contaminados foram o veículo de infeção (CDC, 2011).

E. coli está presente no trato intestinal de animais e homens e pode ser encontrada como contaminante do solo, água e plantas. Esse microrganismo, geralmente, não sobrevive por muito tempo no solo e na planta, portanto a sua presença sugere contaminação recente (EMBRAPA, 2006). Muitas estirpes desse microrganismo são habitantes naturais do trato intestinal humano, portanto, devido a este fato considera-se um bom índice de contaminação fecal, este foi referido como critério de higiene no Regulamento (CE) n.º 2073/2005 (alterada, Regulamento CE n.º 1441/2007) (relativo a critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios) A *E. coli*, é utilizado como indicador de contaminação fecal e nível de higiene. Geralmente, são inofensivos, entretanto, outras estirpes, como *E. coli* O157:H7, são capazes de causar doenças e morte ao homem.

A *E. coli* O157:H7 tem sido reconhecida em anos recentes como agente patogénico responsável por surtos de origem alimentar, incluindo produtos frescos. A *E. coli* O157:H7 difere da maioria das outras estirpes já que se multiplica pouco ou não se multiplica a 44°C. Esse microrganismo é capaz de crescer em temperatura abaixo de 8°C e é tolerante a pH ácido. Flutuações na temperatura de armazenagem de MP de pré-cortados, podem propiciar oportunidade de sobrevivência para esse microrganismo, criando um risco à saúde pública (EMBRAPA, 2006).

O mais importante a observar a partir de uma perspectiva de segurança alimentar são a *E. coli* produtora de verotoxina (VTEC). Apesar do número

relativamente baixo de casos de infecção por VTEC comparada com a de *Salmonella* e *Campylobacter*, a consequência potencialmente fatal da doença particularmente em jovens e idosos dão uma alta importância no que se refere à saúde pública. Estima-se que a infecção por VTEC é a causa de aproximadamente 70% dos casos de insuficiência renal aguda em crianças. O consumo de números muito baixos de VTEC viável nos alimentos é suficiente para causar infecção (Health Protection Agency, 2009).

Um aumento significativo no número de casos de *E. coli*, especificamente *E. coli* O157, foi observada no Reino Unido no final de junho, e o incidente foi declarado e gerido como uma epidemia nacional. Em 1 de Julho de 2016, o Regulamento Sanitário Internacional (2005) ponto focal para o Reino Unido notificou a WHO de um surto de EHEC na Inglaterra e País de Gales causada pela *E. coli* O157 PT34, produtora da Shiga toxina. o Reino Unido relatou 161 casos, dos quais 157 foram confirmados e 4 foram provável. Um total de 66 pacientes procuraram atendimento hospitalar para a sua doença, dos quais 56 foram confirmados. Nove pacientes tinham sintomas consistentes da HUS, e dois pacientes morreram. O evento foi considerado um surto limitado ao Reino Unido. No entanto, a fonte do surto ainda não foi identificada, embora investigações continuadas sugerem uma forte associação com a ingestão de folhas de salada mista (WHO, 2016; PHE, 2016).

Este é apenas o mais recente de uma longa lista surtos relacionados a com saladas e legumes MP. Por exemplo, em 2015, nos Estados Unidos (EUA) foi registado um surto de *Escherichia coli* O157:H7 produtora da *Shiga* toxina (STEC O157:H7), em sete estados, 19 pessoas infectadas, cinco (29%) pessoas foram hospitalizadas, e duas pessoas desenvolveram HUS. Não foram relatadas mortes. As evidências epidemiológicas recolhidas durante a investigação sugerem que uma determinada *salada de frango assado* foi a provável fonte deste surto. A FDA realizou uma investigação de rastreamento dos ingredientes por ela regulados, utilizados na salada de frango em questão para tentar determinar qual o ingrediente estava ligada à doença. No entanto, a investigação de rastreamento não identificou uma fonte comum de contaminação (CDC, 2015).

Em 2014, também nos Estados Unidos, foi registado um surto de *Escherichia coli* O121, produtora da *Shiga* toxina (STEC O121), em seis estados, 19 pessoas infectadas, oito (44%) pessoas necessitaram de cuidados hospitalares, entretanto nenhum dos doentes desenvolveram a SHU, e nenhuma morte foi relatada.

Rastreamento Epidemiológico e inquéritos indicaram que brotos de couve foram a provável fonte deste surto (CDC, 2014).

Em 2013 nos EUA foram registados em quatro estados um surto de STEC O157:H7 com um total de 33 pessoas infectadas, 11 (32%) das pessoas doentes foram hospitalizadas. Duas pessoas doentes desenvolveram a HUS, e nenhuma morte foi relatada. Rastreamento epidemiológicos e inquéritos efetuados indicaram que o consumo de duas saladas prontas: salada fresca picada com frango grelhado e salada mista com franco, pimenta e limão foram as prováveis fontes deste surto (CDC, 2013).

Em 2011, a Alemanha viu-se envolvida num surto de *E. coli* com uma estirpe denominada O104:H4, que produz as toxinas *Shiga* ou verotoxinas. A Alemanha notificou a WHO deste surto, considerando-se que tal “constituía uma potencial situação de saúde pública de preocupação internacional”. Na sua última nota sobre o surto de *E. coli*, a WHO relatou que 16 países (na Europa e América do Norte) reportaram casos de infecção pela bactéria. A Alemanha foi o país mais afectado por esta estirpe de *E. coli*: 908 pessoas foram infectadas com HUS e 34 vítimas fatais; a infecção por EHEC resultou em 3167 casos e 16 mortes. As investigações epidemiológicas indicam fortemente uma fonte alimentar que tenha sido contaminado com fezes, vegetais frescos tem sido a principal hipótese. Há evidências que implicam brotos de feijão e outros rebentos como o veículo responsável. Porém esse fato não foi confirmado (WHO, 2011; Lopes, *et al.*, 2012).

Em 2007, houve um surto de infecção de *E. coli* O157 associados ao alface, em vários países. Pelo menos 50 pessoas na Islândia e Holanda ficaram doentes após consumirem, alface pré-embalado de processamento holandês. Em 2006, nos EUA, mais de 200 pessoas foram infectadas pela *E. coli* O157:H7 após comerem espinafre minimamente processado embalado, quase um terço dos afetados desenvolveram complicações potencialmente graves, como a síndrome hemolítica urémica, e pelo menos uma pessoa morreu (Food Safety Whatch, 2009).

Mesmo assim, o produto fresco continua a ser um veículo relativamente incomum para a doença de origem alimentar, embora as evidências nos EUA, em particular, sugerem que o número de focos ligados a frutas e legumes está crescendo. Infelizmente, os surtos relacionados com salada pode ter um impacto na saúde pública desproporcionalmente grande, apesar de sua raridade comparativa. Eles muitas vezes ocorrem em uma área geográfica mais ampla, são mais prolongados e mais difíceis de

identificar do que aqueles causados por outros grupos de alimentos. Números recentes da CDC nos EUA revelam que, 40% dos surtos entre 2010 e 2014 foram causados por *E. coli* produtora de *Shiga* toxina, estes foram associados com folhas verdes e produtos vegetais semelhantes (Food Safety Whatch, 2016). O surto relacionados a produtos MP assustam os consumidores porque de repente, eles estão sendo informados de que um grupo de produtos alimentares anteriormente considerados saudáveis e de baixo risco pode na verdade levar um grave perigo e serem uma “nova” ameaça à saúde pública (Food Safety Whatch, 2009).

Em uma revisão abrangente da segurança de MP elaborada pela Agência de Proteção à Saúde do Reino Unido maioria dos surtos ligados à saladas ocorreu nos sectores de *foodservice* e *catering* e foram associados a manipuladores de alimentos infectados, a contaminação cruzada e mau armazenamento. Apenas dois surtos foram associados com saladas prontas vendidas para consumir (Food Safety Whatch, 2009).

Os surtos descritos acima, além de muitos outros têm manchado a imagem de segurança de saladas prontas para consumir. Isto coincidiu com um aumento dramático na demanda por esses produtos em resposta às campanhas alimentares saudáveis (Food Safety Whatch, 2009).

Estes são apenas alguns dos muitos desses surtos internacionais registadas nos últimos anos que ilustram claramente o problema.

A busca incessante da qualidade, seja na produção, transporte, armazenamento e consumo de alimentos, é fator primordial na competição entre as empresas de produtos MP. Esse segmento de mercado está em ascensão, entretanto sabe-se que é de fundamental importância o conhecimento da fisiologia dos VMP e dos microrganismos que podem ser carreados por eles, sejam eles de alteração ou patogênicos (EMBRAPA, 2006).

4. Materiais e Métodos

Foi realizado um estudo para a avaliação da qualidade microbiológica de produtos IV Gama, nomeadamente saladas de vegetais contendo 1, 3 e 4 variedades de folhas, num total de 45 amostras. Estudo esse que decorreu nos meses de novembro e dezembro de 2015 e que incidiu sobre amostras recolhidas em 9 grandes superfícies de vendas localizados na grande Lisboa. Em cada local foi igualmente efetuado um estudo observacional sobre os pré-requisitos em termos de armazenagem e acondicionamento de exposição, tendo sido adquiridas amostras para posterior análise microbiológica. Para colheita das informações foram tomados cuidados éticos necessários, sendo estas mantidas em sigilo.

4.1. Pré-requisitos Associados ao Local de Exposição dos Produtos

4.1.1. Requisitos para Zona de Armazenamento a Frio

Os aspectos considerados foram: limpeza, estado de conservação dos equipamentos, estiva e arrumação dos expositores nos pontos de venda, estes foram avaliados por meio de uma “*checklist*” (lista de verificação). A lista de verificação foi preenchida “*in loco*” após avaliação visual dos equipamentos. Esta avaliação foi realizada de forma rápida e sumária de forma que não atraísse as atenções.

Foram analisados 5 itens. A avaliação foi feita em duas classes (sim/não) e de acordo com critérios estabelecidos (tabela 2).

Sim: quando determinado subitem está de acordo; Não: quando determinado subitem não está de acordo.

Tabela 2 *Checklist* Temperaturas e Condições Higiênico-Sanitárias dos Expositores

	SIM	NÃO	Procedimento Correto	Método de Avaliação
Termômetros para leitura de temperaturas aparente			Deve existir pelo menos um termômetro de fácil visualização que permita confirmar a temperatura de todos os equipamentos.	Verificar se todas as câmaras possuem termômetro
Limpeza dos equipamentos, tendo em atenção a acumulação de gelo			Os equipamentos de refrigeração não devem ter gelo aparente nem sinais de descongelação	Visual
Limpeza aparente das prateleiras			Ausência de detritos ou de sujidade visível no interior dos equipamentos, nomeadamente nas prateleiras	Visual
Estado de conservação das prateleiras			Ausência de degradação dos materiais. Substituí-las sempre que necessário.	Visual
Estiva Correta			Os géneros alimentícios devem ser arrumados sempre com produtos da mesma Gama (MP). O equipamento deve estar cheio até, no máximo, 2/3 da sua capacidade, para permitir a livre circulação de ar frio.	Visual

4.1.2. Controlo da Temperatura

Foram aferidas as temperaturas das amostras que se encontravam no limite das prateleiras, através das embalagens sem que as mesmas fossem violadas, por um Termômetro Laser *Louis Tellier Réf N 3124*, com faixa de medição de temperatura: -50°C à + 400°C, precisão: +/- 1,0°C, resolução: 0,1°C, tempo de resposta: 1 segundo, distância máxima de uso: 9 metros. Também foram verificadas as temperaturas apresentadas nos mostradores dos expositores nos pontos de venda.

4.2. Amostragem

4.2.1. Colheita e Envio

Foram recolhidas um total de 45 amostras, embalagens que continham 1 tipo de vegetal, 3 e 4 tipos vegetais. As amostras com 1 tipo de vegetal n=16 (35,6%),

foram classificadas como amostras “A” (AmA), as amostras com 3 tipos de vegetais, n=15 (33,3%), foram classificadas como amostras “B” (AmB) e por fim as amostras com 4 tipos de vegetais, n=14 (31,1%), foram classificadas como amostras “C” (AmC). Após a recolha foram transportadas para análise microbiológica.

As embalagens de saladas escolhidas constaram dos seguintes tipos de vegetais:

- AmA - Alface tipo Iceberg (1 tipo de vegetal);
- AmB - Alface escarola, alface *radicchio* e *canónigos* (3 tipos de vegetais) e
- AmC - Folha de ervilha, *red oak*, *canónigos* e cebolinho (4 tipos de vegetais).

A recolha das amostras foi efetuada de forma aleatória, 3 amostras por vez uma de cada tipo de acordo com a disponibilidade nas superfícies de vendas, foram verificadas as datas de validades das amostras selecionadas, as mesmas foram postas em contentor isotérmico com termo-acumuladores, a uma temperatura aproximada de 4°C, todas amostras coletadas foram submetidas a análise microbiológica no mesmo dia da recolha, no Laboratório de Microbiologia Alimentar da Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril (ESHTE).

4.3. Avaliação Microbiológica

4.3.1. Preparação das Amostras

Os produtos foram analisados recorrendo a técnicas e metodologias clássicas de microbiologia alimentar. A preparação das amostras foi feita de acordo com procedimento estipulado na Norma ISO 7218: 2007, em condições de assepsia evitando qualquer contaminação para uma perfeita uniformidade da distribuição dos microrganismos (ISO 7218: 2007).

De cada amostra foram retiradas e pesados 10g numa balança centesimal (Kern® FOK 11K1M), que foram suspensos em 90 ml de água peptonada tamponada (APT) num saco de homogeneizador (Stomacher® Bags BA6041, Steward), homogeneizados no equipamento Stomacher® 400 circulator (Seward) sendo obtida e suspensão mãe, ou seja a diluição 10^{-1} . De seguida foram efetuadas diluições

decimais em série, sempre transferindo 1 ml de cada diluição para tubos esterilizados contendo 9 ml de diluente APT.

Para cada amostra foram analisados qualitativo e quantitativamente os seguintes parâmetros: Contagens totais a 30°C, Enterobactérias, *Escherichia coli*, Bolores e Leveduras e *Pseudomonas* spp.

4.3.2. Contagens totais a 30°C

As contagens totais a 30°C foram realizadas em placas de Petri com Meio *Plate Count Agar* (PCA), previamente fundido, e foram inoculadas em 1 ml das diluições das amostras de cada salada. O inóculo foi semeado por incorporação. As culturas foram incubadas a 30°C durante 72h. A contagem microbiológica expressou-se em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/g) (NP 4405: 2002).

4.3.3. Pesquisa e contagem de Enterobactérias

A pesquisa e contagem Enterobactérias foi feita através de sementeira por incorporação, foi inoculado 1ml da suspensão-mãe e de cada diluição numa placa de Petri em meio *Violet Red Bile Glucose* (VRGB) e incubada a 37°C±1°C durante 24h±3h (NP 4137: 1991).

4.3.4. Pesquisa e contagem de *Escherichia coli*

A identificação de *E. coli* foi feita através do meio *Tryptone Bile X-Glucuronide Agar* (TBX). As placas foram incubadas a 44°C durante 18 a 24 horas. As colónias de morfologia típica de *E. coli* identificam-se pela cor azul, devido à ação da β-D-glucuronidase (NP 4396: 2002).

4.3.5. Pesquisa e contagem de Bolores e Leveduras

A pesquisa de bolores e leveduras deu-se por sementeiras à superfície de 1mL de inóculo disposto por 5 placas (0.2mL por placa) de *Rose Bengal Chloramphenicol Agar*, incubadas até 120 horas a 22°C. Após a incubação, as colónias eram contadas separadamente os bolores das leveduras (NP 3277-2/1987).

4.3.6. Pesquisa e contagem de *Pseudomonas* spp.

Para a pesquisa de *Pseudomonas* spp. foi utilizado o meio de cultura *Pseudomonas Agar Base* SR0103EO foram realizadas sementeiras à superfície de 0,2mL cada uma das diluições, período de incubação das sementeiras foi de 24 a 48 horas a 30°C, com controlo diário.

4.4. Critérios de Classificação

Devido falta de legislação específica para às saladas de vegetais crus em Portugal, utilizaram-se os valores guia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) publicados em 2005 para a apreciação dos resultados de análises microbiológicas quantitativas e qualitativas em alimentos prontos a consumir (Santos *et al.*, 2005).

O INSA não dispõe de valores guia para o este parâmetro *Pseudomonas* spp. Foi portanto utilizado para avaliar *Pseudomonas* spp. os valores de Microrganismos a 30°C. Os resultados obtidos para contagem de *Enterobacteriaceae* a 37°C foram avaliados tendo por base os critérios estabelecidos nos “Valores Guia, INSA” para o parâmetro “coliformes fecais” referidos pelos autores (Correia *et al.*, 2015).

Tabela 3 - Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a consumir

Microrganismo	Qualidade Microbiológica (UFC/g)			
	Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório	Inaceitável/ Potencialmente Perigoso
Microrganismos a 30°C	$\leq 10^4$	$>10^4$ $\leq 10^6$	$>10^6$	NA
Leveduras	$\leq 10^2$	$>10^2$ $\leq 10^5$	$>10^5$	NA
Bolores	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3$	#
Enterobactérias	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
<i>Escherichia coli</i>	≤ 10	$>10 < 10^2$	$\geq 10^2$	NA
<i>Pseudomonas spp</i>	$\leq 10^4$	$>10^4$ $\leq 10^6$	$>10^6$	NA

Fonte: Adaptado de Santos *et al.*, 2005 e Correia *et al.*, 2015.

- # - Equacionado caso a caso
- NA - Não aplicável

4.5. Tratamento Estatístico

Após a constituição da amostra realizamos uma análise descritiva, com recurso a medidas de tendência central (média amostral e mediana amostral), medida de dispersão (desvio padrão) e análise gráfica.

A análise quantitativa, descritiva e comparativa dos resultados foram feitas pelos programas *Microsoft® Excel®* para Mac 2011, versão 14.6.6 e *software IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®)* versão 21.0, 2012.

Selecionamos o Teste de Associação Coeficiente de Correlação de *Pearson (r)* para verificar se havia correlação entre proximidade da data de consumo e as contagens microbiológicas. E também para verificar se havia correlação entre as temperaturas das embalagens e as contagens microbiológicas, por dois motivos: (1) a questão de investigação aponta no sentido de um teste de associação (relacionadas) e (2) as variáveis em jogo são intervalares.

Qualquer teste estatístico trabalha sempre com duas hipóteses estatísticas: a

hipótese nula, representada por H_0 , e a hipótese alternativa, H_1 . Subjacente à hipótese nula (H_0) está o pressuposto de que os resultados encontrados na amostra se devem ao acaso. Assim, no caso dos testes de associação, a hipótese nula postulará que não há associação (na população-alvo) entre a variável A e B por exemplo (Martins, 2011).

Por seu turno, subjacente à hipótese alternativa (H_1) encontra-se o pressuposto de que os resultados encontrados não são devidos ao acaso e que é bastante provável que estes existam na população-alvo. A hipótese alternativa será a de que há associação (na população-alvo) entre as variáveis AmA, AmB e AmC por exemplo (Martins, 2011).

O teste não-paramétrico, *Kruskal-Wallis* também foi utilizado. Selecionou-se o Teste de *Kruskal-Wallis* por dois motivos: (1) a questão de investigação aponta no sentido de um design inter-sujeitos (isto é, testes de diferenças para amostras independentes) e (2) onde serão comparados três grupos (AmA, AmB e AmC) (Martins, 2011).

5. Resultados

5.1. Pré-requisitos Associados ao Local de Exposição dos Produtos

5.1.1. Checklist

Foram analisados 5 itens, em 9 locais diferentes num total de 15 inspeções. Os resultados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Condições de exposição de saladas prontas para consumo na grande Lisboa

	SIM		NÃO	
	%	n. de inspeções	%	n. de inspeções
Termómetros para leitura de temperaturas aparente	100%	15	-	-
Limpeza dos equipamentos, tendo em atenção a acumulação de gelo	86.7%	13	13.3%	2
Limpeza aparente das prateleiras	80.0%	12	20.0%	3
Estado de conservação das prateleiras	86.7%	13	13.3%	2
Estiva correta	-	-	100%	15

Todos os estabelecimentos tinham termómetros para leitura de temperaturas aparente ao fácil alcance da visão.

Analisando o item “Limpeza dos equipamentos tendo em atenção a acumulação de gelo”, 13,3% (2) dos equipamento tinham gelo aparente e apresentavam sinais de descongelação.

Relativamente a “Limpeza aparente das prateleiras”, 20,0% (3) das prateleiras encontram-se com uma higienização visualmente deficiente.

Quanto ao “Estado de conservação das prateleiras”, 13,3% (2) estavam em mau estado de conservação, nomeadamente, com vestígios de oxidação. A oxidação das prateleiras estava em contato com as embalagens dos VMP, ao mesmo tempo as câmaras apresentavam uma higienização visivelmente deficiente.

Ao que se respeita a “Estiva correta”, todas as superfícies apresentavam estiva inadequada.

5.1.2. Temperatura dos Equipamentos de Refrigeração dos VMP

Foram analisadas as temperaturas afixadas pelos mostradores das câmaras 15 vezes em 9 superfícies diferentes. A temperatura média das câmaras foi de 2,3°C com uma variação de 1,9°C. Metade das câmaras tiveram uma temperatura inferior a 2,8°C. As temperaturas mínimas e máximas das câmaras foram de -2,7°C e 5,3°C respectivamente. Assim como se pode observar na tabela 5.

Tabela 5 - Temperaturas dos Equipamentos de Refrigeração dos VMP

Amostra	Média °C	Mediana °C	Desvio Padrão °C	Mínimo °C	Máximo °C
Total	2,3	2,8	1,9	-2,7	5,3

5.1.3. Temperatura das Embalagens das Saladas Prontas para o Consumo

A temperatura média das amostras foi de 8,3°C com uma variação de 2,8°C. Metade das embalagens apresentaram uma temperatura inferior a 7,8°C, as temperaturas mínimas e máximas das embalagens foram 3,7°C e 14,8°C, respectivamente. Os resultados estão dispostos na tabela 6.

Tabela 6 - Temperaturas das Embalagens das Saladas Prontas para o Consumo

Amostra	Média °C	Mediana °C	Desvio Padrão °C	Mínimo °C	Máximo °C
AmA	8,7	8,1	1,9	6,8	12,4
AmB	7,7	7,4	3,1	3,7	14,8
AmC	8,4	7,9	3,5	3,9	14,6
Total	8,3	7,8	2,8	3,7	14,8

5.2. Análises Microbiológicas

Na tabela 7 constam os valores da média, mediana e desvio padrão das contagens de microrganismos totais a 30°C, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, Bolores, Leveduras e *Pseudomonas spp.*, para os três tipos de amostras.

Tabela 7 – Análise Microbiológica das Saladas Prontas para o Consumo

Microrganismos	Amostra	Média (ufc/g)	Mediana (ufc/g)	Desvio Padrão (ufc/g)
Contagens Totais a 30°C	Total	$3,6 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^8$
	AmA	$1,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$
	AmB	$1,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
	AmC	$9,5 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$
<i>Enterobacteriaceae</i>	Total	$8,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^6$
	AmA	$1,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$
	AmB	$1,2 \times 10^6$	$9,8 \times 10^4$	$3,6 \times 10^6$
	AmC	$1,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$
<i>Escherichia coli</i>	Total	<10	<10	<10
	AmA	<10	<10	<10
	AmB	<10	<10	<10
	AmC	<10	<10	<10
Bolores	Total	$1,2 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$	$3,7 \times 10^2$
	AmA	$2,9 \times 10^1$	$3,5 \times 10^1$	$3,2 \times 10^1$
	AmB	$7,5 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$1,2 \times 10^2$
	AmC	$2,8 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$	$6,4 \times 10^2$
Leveduras	Total	$4,1 \times 10^3$	$8,6 \times 10^2$	$1,3 \times 10^4$
	AmA	$2,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$
	AmB	$4,3 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$6,4 \times 10^3$
	AmC	$8,3 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$2,1 \times 10^4$
<i>Pseudomonas spp.</i>	Total	$2,1 \times 10^7$	$4,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^7$
	AmA	$1,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
	AmB	$1,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
	AmC	$5,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$

AmA: 1 tipo de vegetal /AmB: 3 tipos de vegetais /AmC: 4 tipos de vegetais

Por meio da leitura da tabela 7 podemos observar que a média contagens de microrganismos totais a 30°C foi de $3,6 \times 10^7$ ufc/g com uma variação de $1,0 \times 10^8$

ufc/g. Metade das amostras apresentaram valores superiores a $5,0 \times 10^6$ ufc/g. As AmA e AmB apresentaram valores de média, mediana e desvio padrão inferiores as AmC.

Relativamente as contagens de *Enterobacteriaceae* os valores da média da mediana e desvio padrão na amostra total são respectivamente: $8,1 \times 10^5$, $3,2 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^6$ ufc/g. As AmA apresentam um desvio padrão inferior, refletindo uma menor dispersão dos dados em torno da média.

Quanto as contagens de *Escherichia coli* não se obtiveram resultados positivos para a presença do microrganismo.

Com relação as contagens Bolores os valores da média, da mediana e do desvio padrão na amostra total são: $1,2 \times 10^2$, $3,0 \times 10^1$ e $3,7 \times 10^2$ ufc/g respectivamente. As AmC apresentaram valores mais elevados.

Para as contagens de Leveduras os valores da média, da mediana e do desvio padrão na amostra total são: $4,1 \times 10^3$, $8,6 \times 10^2$ e $1,3 \times 10^4$ ufc/g respectivamente. As AmA apresentam um desvio padrão inferior $3,4 \times 10^2$ ufc/g, refletindo uma menor dispersão dos dados em torno da média.

Relativamente as contagens de *Pseudomonas* spp. podemos verificar que os valores da média, da mediana e do desvio padrão na amostra total são: $2,1 \times 10^7$, $4,5 \times 10^6$ e $4,3 \times 10^7$ ufc/g respectivamente. Esse foi o parâmetro com contagens mais elevadas de todos os parâmetros analisados.

Em todos os parâmetros analisados as AmA obtiveram contagens mais baixas e um desvio padrão também com valores inferiores se comparadas as AmB e AmC, o que reflete uma menor dispersão dos dados em torno da média. As AmC obtiveram contagens mais elevadas em todos os parâmetros analisados a exceção da *Escherichia coli* onde não se obteve resultados positivos para a presença do microrganismo.

5.3. Classificação das Amostras em Função do Parâmetro Microbiológico

As amostras foram classificadas de acordo com valores guia para avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos prontos a comer. A classificação da qualidade microbiológica foi dada como “Satisfatório”, “Aceitável” e “Não satisfatório” (Santos *et. al.*, 2005).

Tabela 8 - Classificação e Avaliação da Qualidade Microbiológica das Saladas Embaladas Prontas para Consumo, Comercializadas em Lisboa

Microorganismos	Amostra	Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório
Contagens Totais a 30°C	Total	6,7% (3)	53,3% (24)	40,0% (18)
	A	18,8% (3)	81,3% (13)	-
	B	-	46,7% (7)	53,3% (8)
	C	-	28,6% (4)	71,4% (10)
Enterobacteriaceae	Total	13,3% (6)	55,6% (25)	31,1% (14)
	A	37,5% (6)	62,5% (10)	-
	B	-	53,3% (8)	46,7% (7)
	C	-	50,0% (7)	50,0% (7)
Escherichia coli	Total	100% (45)	-	-
	A	100% (16)	-	-
	B	100% (15)	-	-
	C	100% (14)	-	-
Bolores	Total	97,8% (44)	2,2% (1)	-
	A	100% (16)	-	-
	B	100% (15)	-	-
	C	92,9% (13)	7,1% (1)	-
Leveduras	Total	53,3% (24)	46,7% (21)	-
	A	93,8% (15)	6,3% (1)	-
	B	26,7% (4)	73,3% (11)	-
	C	35,7% (5)	64,3% (9)	-
Pseudomonas spp.	Total	2,2% (1)	44,4% (20)	53,3% (24)
	A	6,3% (1)	87,5% (14)	6,3% (1)
	B	-	33,3% (5)	66,7% (10)
	C	-	7,1% (1)	92,9% (13)

Através da leitura da tabela 8 podemos observar a classificação e avaliação da qualidade microbiológica das saladas prontas para consumir, no que respeita a contagens totais a 30°C obtiveram-se 6,7% (3) de resultados são “Satisfatório”, 53,3% (24) de resultados “Aceitável” e 40,0% (18) de resultados “Não satisfatório”. Somente as AmA obtiveram resultados “Satisfatório”, 18,8% (3), 81,3% (13) foram classificadas como “Aceitável” e não houve amostras classificadas como “Não satisfatório”. Relativamente as AmB, 46,7% (7) foram classificadas como “Aceitável” e 53,3% (8) foram classificadas como “Não satisfatório”. Quanto as AmC, encontrou-

se 28,6% (4) dos resultados “Aceitável” e 71,4% (10) dos resultados “Não satisfatório”.

Do total das amostras analisadas para *Enterobacteriaceae* observou-se que 13,3% (6) foram classificadas como “Satisfatório”, 55,6% (25) foram classificadas como “Aceitável” e 31,1% (14) foram classificadas como “Não satisfatório”. Relativamente as AmA, 37,5% (6) foram “Satisfatório”, 55,6% (25) foram “Aceitável” e nenhuma das amostras foram classificadas como “Não satisfatório”. Para as AmB, não houve amostras “Satisfatório”, 53,3% (8) foram classificadas como “Aceitável” e 46,7% (7) foram classificadas como “Não satisfatório”. Para as AmC, metade das amostras 50,0% (7), foram classificadas como “Aceitável” e a outra metade foram classificadas como “Não satisfatório”.

Todas as amostras, obtiveram resultados “Satisfatório” para *Escherichia coli*.

Na quantificação de Bolores os resultados considerados “Satisfatório” foram 97,8% (44), e apenas 2,2% (1) “Aceitável” (AmC), 7,1% (1) “Aceitável”, e não houve resultados “Não satisfatório”.

No que respeita a Leveduras verifica-se um total de 53,3% (24) de amostras “Satisfatório”, 46,7% (21) de amostras “Aceitável” e não houve classificações “Não satisfatório” em todos os tipos de amostras. 93,8% (15) AmA foram classificadas como “Satisfatório” e 6,3% (1) foram classificadas como “Aceitável”. 4 (26,7%) das AmB foram classificadas como “Satisfatório” e 73,3% (11) foram classificadas como “Aceitável”. 35,7% (5) das AmC foram classificadas como “Satisfatórios” e 64,3% (9) foram classificadas como “Aceitáveis”.

Do total das amostras analisadas para *Pseudomonas* spp. notamos que somente 2,2% (1) das amostras foi classificada como “Satisfatório”, 44,4% (20) foram classificadas como “Aceitável” e 53,3% (24) foram classificadas como “Não satisfatório”. Para as AmA, 6,3% (1) foram “Satisfatório”, 87,5% (14) foram “Aceitáveis” e 1(6,3%) foram “Não satisfatórios”. Nenhuma das AmB e AmC foram classificadas como “Satisfatório”, ainda sobre as AmB obtivemos os resultados 33,3% (5) e 66,7% (10) que foram classificados como “Aceitável” e “Não satisfatório” respectivamente. Quanto as AmC, apenas 7,1% (1) foi classificada como “Aceitável” e as demais 92,9% (13) foram classificadas como “Não satisfatório”.

Pela a análise da figura 1, verifica-se que nenhuma das AmA foram classificadas como “Satisfatório”, 87,5% foram classificadas como “Aceitável” e 12,5% foram classificadas como “Não satisfatório”.

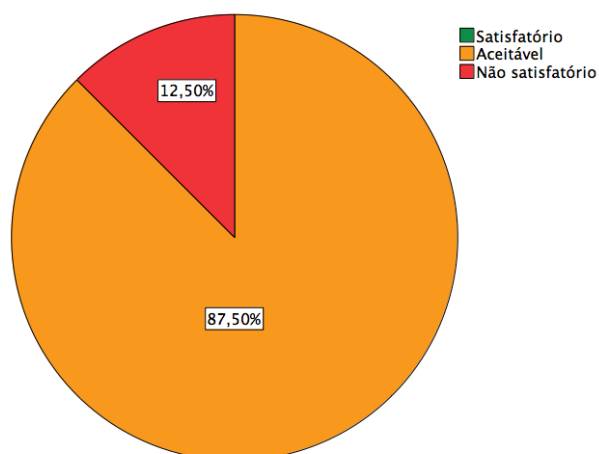


Figura 1 - Classificação final da Avaliação da qualidade microbiológica das AmA.

Pela a análise da figura 2, observamos que nenhuma das AmB foram classificadas como “Satisfatório”, 6,7% foram classificadas como “Aceitáveis” e 93,3% foram classificadas como “Não satisfatório”.

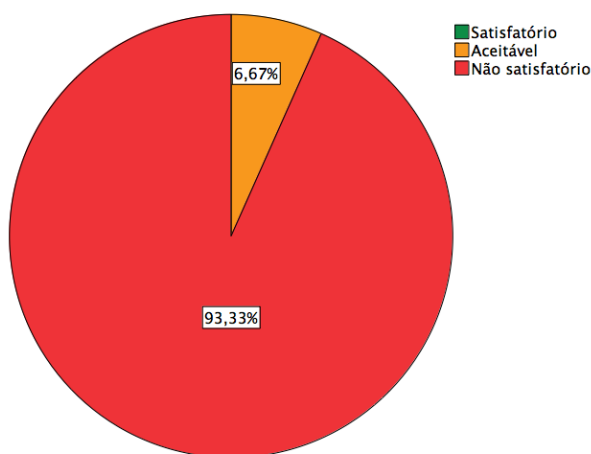


Figura 2 - Classificação final da Avaliação da qualidade microbiológica das AmB.

Para as AmC observamos que nenhuma das amostras foi considerada “Satisfatório”, pelo que são todas classificadas como “Não satisfatórias”.

A figura 3, nos mostra a classificação final de todas as amostras, podemos notar que nenhuma das amostras foram classificadas como “Satisfatório”, 35,6% foram classificadas como “Aceitáveis” e 64,4% foram classificadas como “Não satisfatório”.

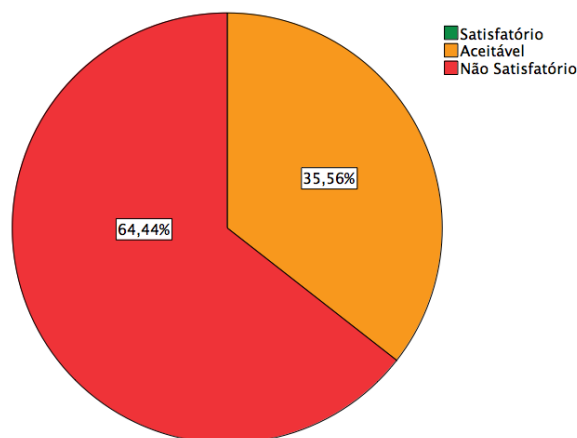


Figura 3 - Classificação final da Avaliação da qualidade microbiológica de todas as amostras.

5.4. Análise de Correlações

5.4.1. Correlação: Proximidade da Data de Consumo e a Quantificação de Microrganismos

Utilizou-se o Teste de Associação Coeficiente de Correlação de *Pearson* (r) e gráficos de dispersão, para verificar se havia correlação entre proximidade da data de consumo e as Contagens totais a 30°C, Enterobactérias, Bolores e Leveduras e *Pseudomonas* spp. O Teste de Correlação de *Pearson* não foi utilizado para correlações com parâmetro *E. coli*, pois este obteve resultados negativos para presença do microrganismo.

No que se refere às Contagens totais a 30°C há uma correlação negativa significativa entre a proximidade da data de consumo e as Contagens totais a 30°C, $r = -,336$, $\rho = ,024$. Menor a distância da Data Limite de Consumo (DLC), maior as Contagens totais a 30°C (figura 4).

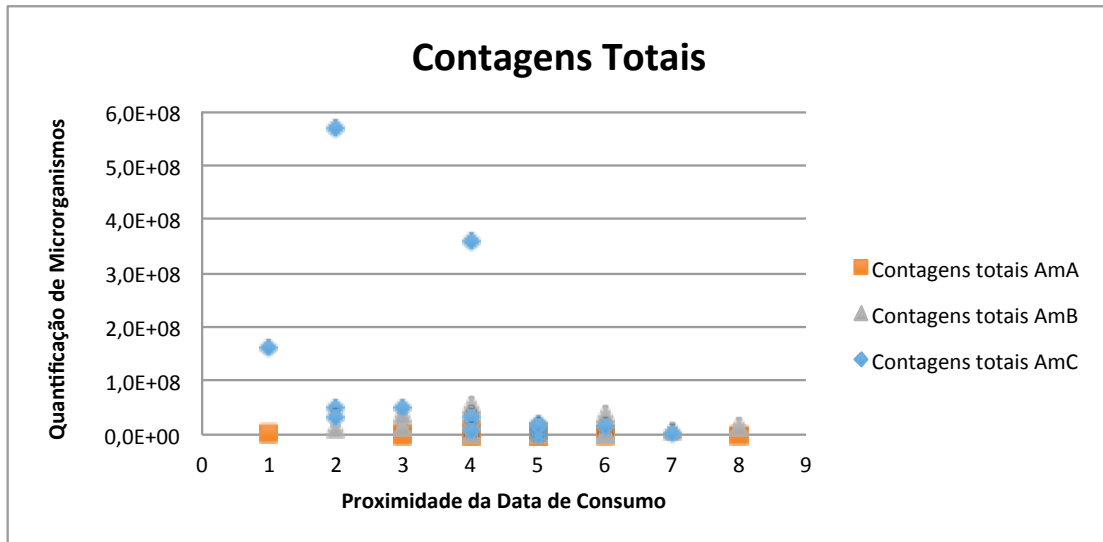


Figura 4 - Gráfico de Dispersão Contagens totais X Proximidade da Data de Consumo em Dias

Relativamente as Enterobactérias não há uma correlação significativa entre a quantificação de Enterobactérias e a proximidade da data de consumo, $r = ,261$, $\rho = ,084$. Não se notou um padrão de variação entre uma variável e outra, no entanto observou-se que havia uma quantificação elevada de Enterobactérias entre seis e dois dias até a DLC, sendo que contagem mais elevada de Enterobactérias foi observada quando ainda restavam oito dias até a DLC (figura 5).

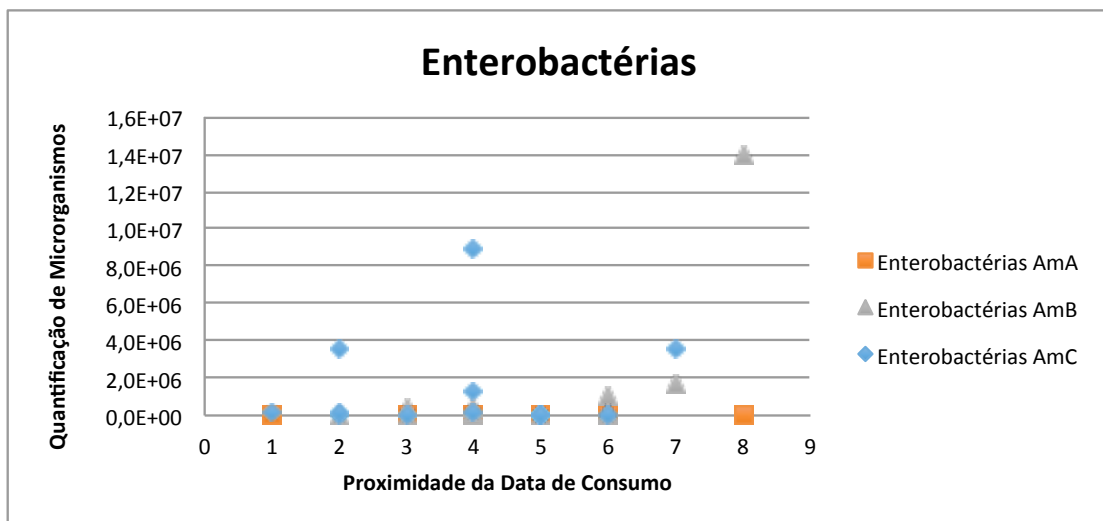


Figura 5 - Gráfico de Dispersão Quantificação Enterobactérias X Proximidade da Data de Consumo em Dias

Quanto aos Bolores não há uma correlação significativa entre a quantificação de Bolores e a proximidade da data de consumo, $r = ,024$, $\rho = ,876$. (figura 6). Não se observou um padrão de variação entre uma variável e outra, as AmC apresentaram uma quantificação ligeiramente mais elevada no quinto dia até ao limite da data de consumo. Nas demais amostras houve uma quantificação muito semelhante em todos os dias até a DLC dos VMP (figura 6).

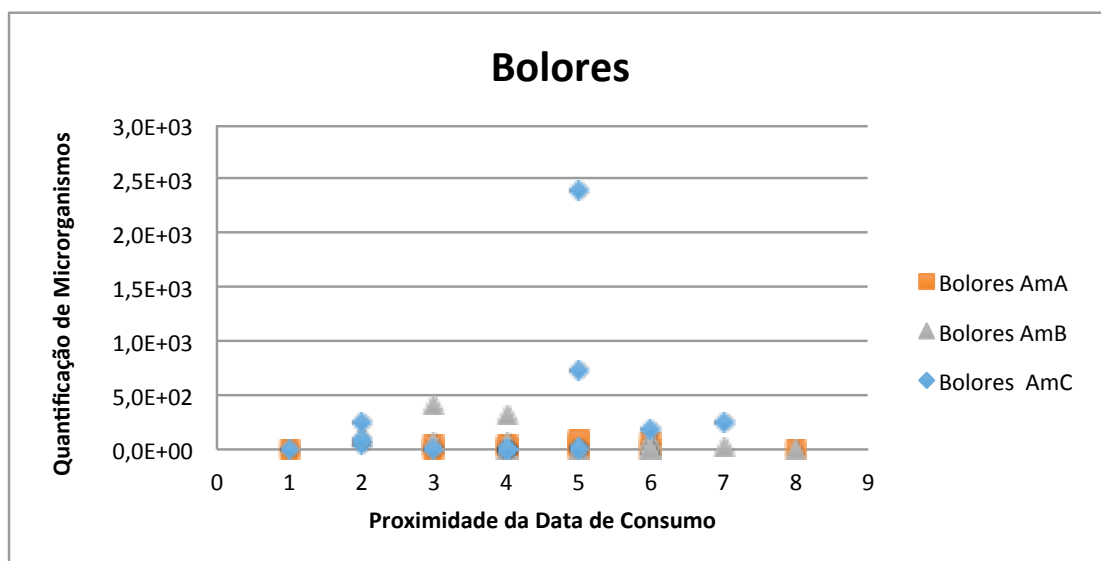


Figura 6 - Gráfico de Dispersão Quantificação de Bolores X Proximidade da Data de Consumo em Dias

Relativamente as Leveduras não há uma correlação significativa entre a quantificação de Leveduras e a proximidade da data de consumo, $r = -,173$, $\rho = ,256$. A quantificação das leveduras das AmC foram mais elevadas quando faltavam dois até a DLC dos VMP. No entanto, não se observou um padrão de variação entre uma variável e outra (figura 7).

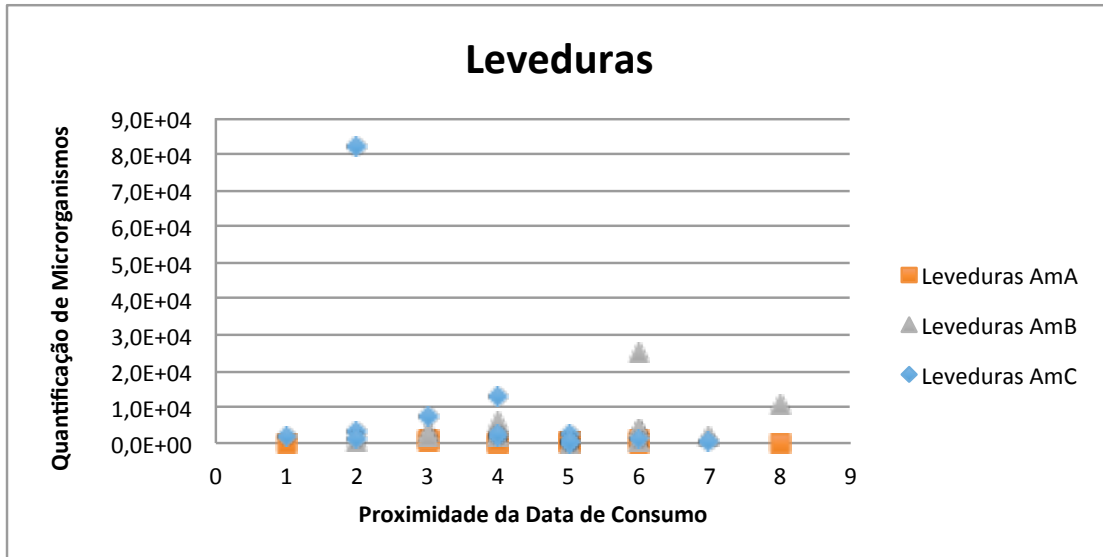


Figura 7 - Gráfico de Dispersão Quantificação de Leveduras X Proximidade da Data de Consumo em Dias

No que se respeita as *Pseudomonas* spp. não há uma correlação significativa entre a proximidade da data de consumo e as contagens de *Pseudomonas* spp., $r = -0,206$, $\rho = 0,175$. Contagens elevadas de *Pseudomonas* spp. estavam associadas a um dia até a DLC, assim como, contagens elevadas estavam associadas a oito dias até a DLC (figura 8).

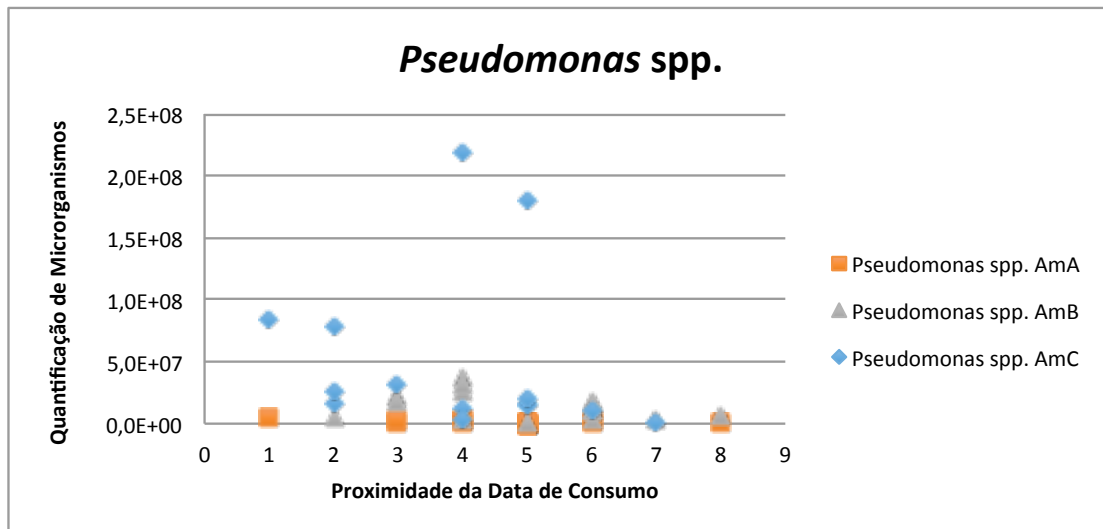


Figura 8 - Gráfico de Dispersão Quantificação de *Pseudomonas* spp. X Proximidade da Data de Consumo em Dias

5.4.2. Correlação: Temperatura das Embalagens e a Quantificação de Microrganismos

Para a verificar se existe correlação entre as temperaturas das embalagens e as Contagens totais a 30°C, Enterobactérias, Bolores, Leveduras e *Pseudomonas* spp., também utilizamos Teste de Associação Coeficiente de Correlação de *Pearson* (r) e gráficos de dispersão para cada tipo de amostra.

Relativamente as Contagens Totais a 30°C nas AmA houve uma correlação significativa positiva entre as temperaturas das embalagens e as Contagens totais a 30°C, $r = ,620$, $\rho = ,010$. Maior as temperaturas, maior as contagens totais a 30°C. Nas AmB ($r = ,045$, $\rho = ,872$) e AmC ($r = ,062$, $\rho = ,834$) não houveram correlações significativas entre as temperaturas das embalagens e as contagens totais a 30°C (figura 9). Entretanto observou-se uma quantificação mais elevada de microrganismos em temperaturas maiores ou iguais a 4°C.

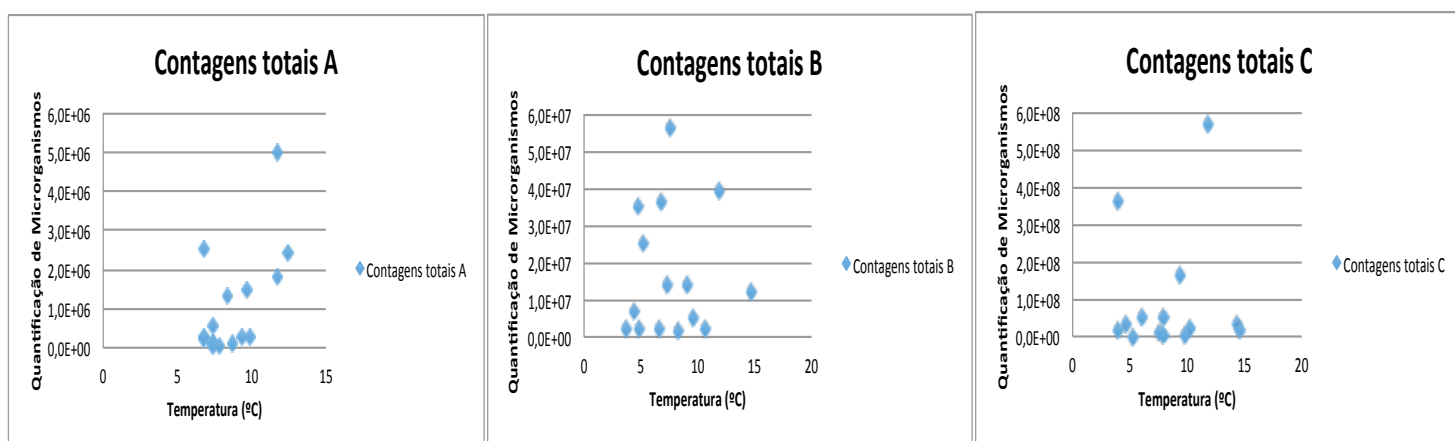


Figura 9 – Gráfico de Dispersão Temperatura das Embalagens X Contagens a 30°C Totais por Tipo de Amostra

Quanto as Enterobactérias não houve uma correlação significativa entre as temperaturas das embalagens e a quantificação de Enterobactérias, AmA ($r = -,190$, $\rho = ,480$), AmB ($r = ,177$, $\rho = ,529$) e AmC ($r = -,199$, $\rho = ,495$). Havia valores elevados nas temperaturas que estavam associados com valores elevados na quantificação, assim como existiam valores elevados nas temperaturas que estavam associados a valores intermediários ou mesmo reduzidos na quantificação.

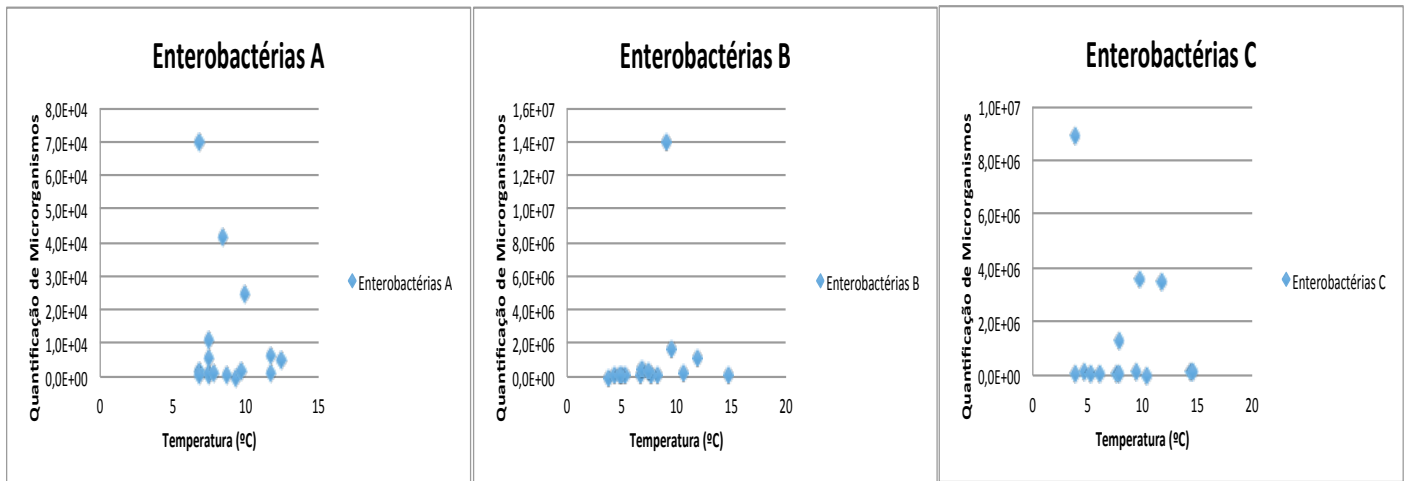


Figura 10 - Gráfico de Dispersão Temperatura das Embalagens X Contagens de Enterobactérias por Tipo de Amostra

No que respeita os Bolores não houve uma correlação significativa entre as temperaturas das embalagens e a quantificação de Bolores, AmA ($r = -,103$, $\rho = ,750$), AmB ($r = ,245$, $\rho = ,379$) e AmC ($r = ,229$, $\rho = ,431$). Tal como as Contagens Totais se observou uma quantificação mais elevada a partir dos 4°C.

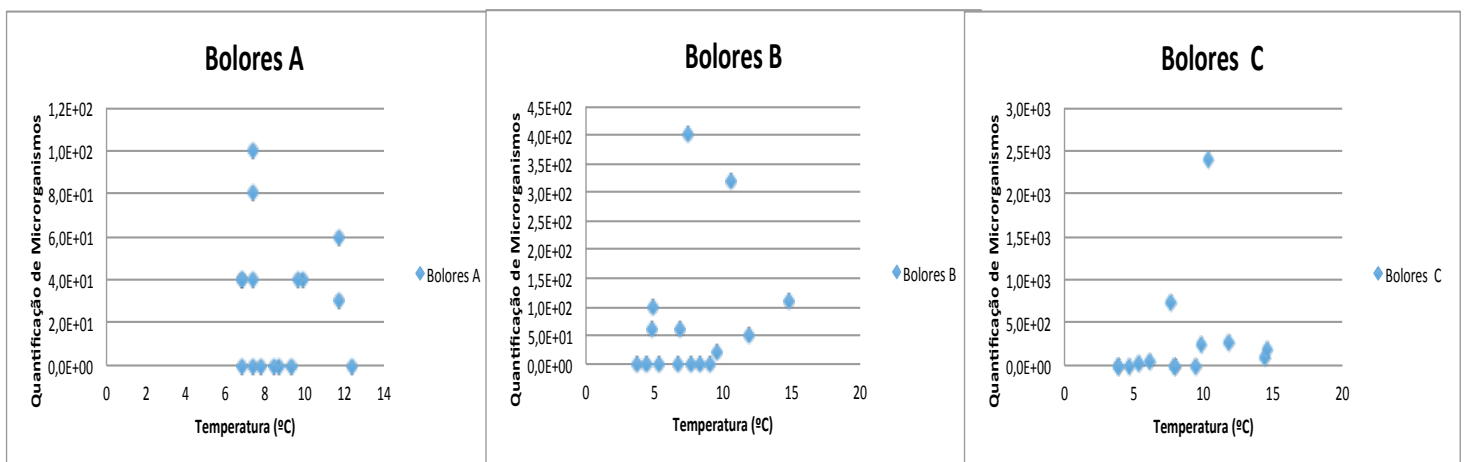


Figura 11 - Gráfico de Dispersão Temperatura das Embalagens X Contagens de Bolores por Tipo de Amostra

Quanto as Leveduras não houve uma correlação significativa entre as temperaturas das embalagens e a quantificação de Leveduras, AmA ($r = ,081$, $\rho = ,766$), AmB ($r = -,144$, $\rho = ,608$) e AmC ($r = ,212$, $\rho = ,466$). Não se observou nenhuma correlação entre a temperatura das embalagens a quantificação de leveduras, isto é, houve uma dispersão sem correlação como podemos verificar na figura 12.

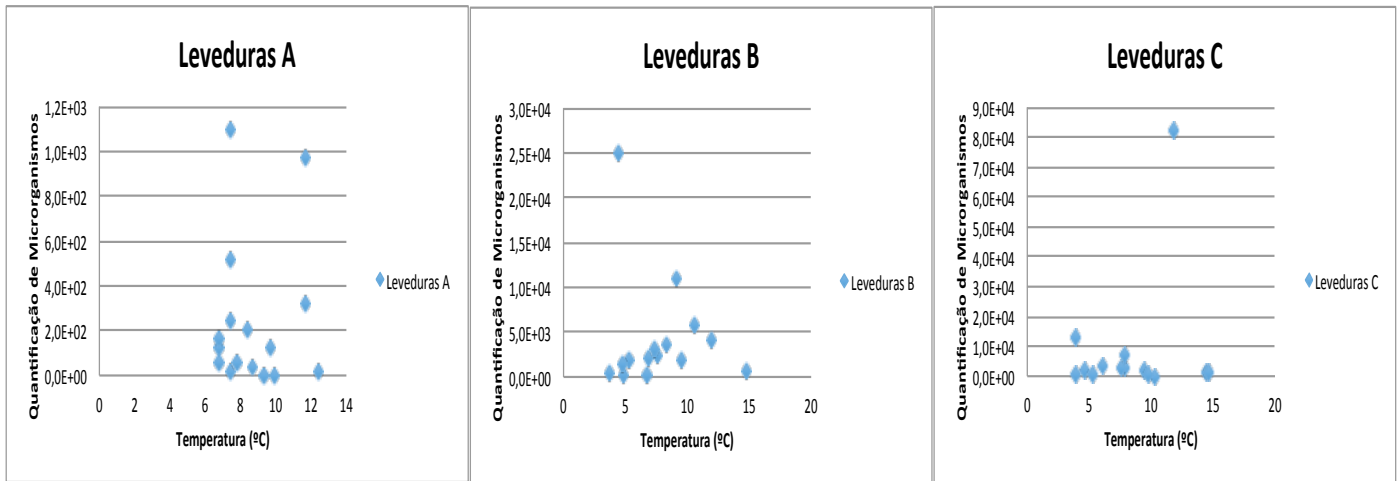


Figura 12 - Gráfico de Dispersão Temperatura das Embalagens X Contagens de Leveduras por Tipo de Amostra

No que respeita as *Pseudomonas* spp. houve uma correlação positiva marginalmente significativa entre as temperaturas das embalagens e a quantificação de *Pseudomonas* spp. nas AmA ($r = ,485$, $\rho = ,057$). Maior as contagens *Pseudomonas* spp., maior as temperaturas das embalagens. E uma correlação negativa significativa entre as temperaturas das embalagens e as contagens de *Pseudomonas* spp., nas AmC ($r = -,551$, $\rho = ,041$). Nas AmB ($r = -,425$, $\rho = ,144$) não houve correlação significativa entre as temperaturas das embalagens e as contagens de *Pseudomonas* spp. (figura 13).

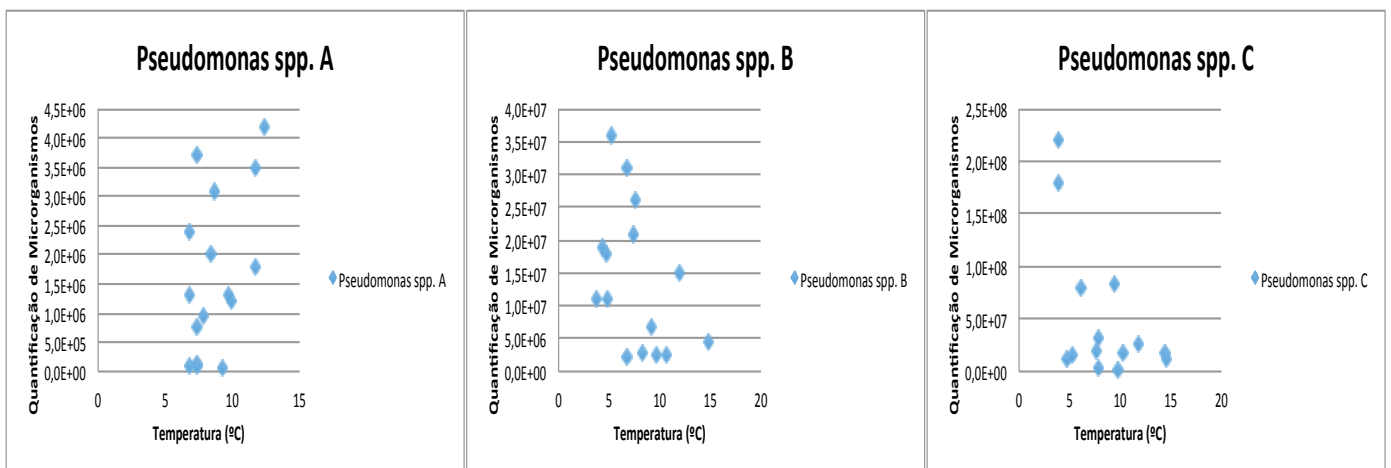


Figura 13 - Gráfico de Dispersão Temperatura das Embalagens X Contagens de *Pseudomonas* spp. por Tipo de Amostra

5.4.3. Comparações entre os Tipos de Amostras e a Quantificação de Microrganismos

Utilizou-se o Teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* (χ^2), para averiguar se há diferenças entre AmA, AmB e AmC e a quantidade de microrganismos nas Contagens totais a 30°C, Enterobactérias, *Escherichia coli*, Bolores e Leveduras e *Pseudomonas* spp. O Teste de *Kruskal-Wallis* não foi utilizado para análise de diferenças com parâmetro *E. coli*, pois este obteve resultados negativos para presença do microrganismo.

Relativamente as Contagens totais, há diferenças significativas entre os tipos de amostras A, B e C e as Contagens totais a 30°C, $\chi^2 (2) = 26,47$, $\rho < ,001$. Testes de *Mann-Whitney* com Correção de *Bonferroni* evidenciaram diferenças significativas entre as amostras AmA e AmB, $U = 16,50$, $\rho < ,001$ bem como foram evidenciadas diferenças significativas entre as amostras AmA e AmC, $U = 6,50$, $\rho < ,001$. Não foram encontradas outras diferenças significativas.

No que respeita a Enterobactérias, há diferenças significativas entre os tipos de amostras AmA, AmB e AmC e a quantidade as Contagens totais a 30°C, $\chi^2 (2) = 21,54$, $\rho < ,001$. Testes de *Mann-Whitney* com Correção de *Bonferroni* evidenciaram diferenças significativas entre as amostras AmA e AmB, $U = 16,50$, $\rho < ,001$ bem como foram evidenciadas diferenças significativas entre as amostras AmA e AmC, $U = 20,00$, $\rho < ,001$. Não foram encontradas outras diferenças significativas.

Quanto aos Bolores, não há diferenças significativas entre os tipos de amostras AmA, AmB e AmC e as contagens de Bolores, $\chi^2 (2) = 1,00$, $\rho = ,605$.

Relativamente as Leveduras, há diferenças significativas entre os tipos de amostras AmA, AmB e AmC e as contagens de Leveduras, $\chi^2 (2) = 18,68$, $\rho < ,001$. Testes de *Mann-Whitney* com Correção de *Bonferroni* evidenciaram diferenças significativas entre as amostras AmA e AmB, $U = 29,00$, $\rho < ,001$ bem como foram evidenciadas diferenças significativas entre as amostras AmA e AmC, $U = 21,50$, $\rho < ,001$. Não foram encontradas outras diferenças significativas.

Quanto as *Pseudomonas* spp., há diferenças significativas entre os tipos de amostras AmA, AmB e AmC e as Contagens *Pseudomonas* spp., $\chi^2 (2) = 25,67$, $\rho < ,001$. Testes de *Mann-Whitney* com Correção de *Bonferroni* evidenciaram diferenças significativas entre as amostras AmA e AmB, $U = 24,00$, $\rho < ,001$ bem como foram

evidenciadas diferenças significativas entre as amostras AmA e AmC, $U = 4,00$, $\rho < ,001$. Não foram encontradas outras diferenças significativas.

Tabela 9 - Diferenças entre os Tipos de Amostras e a Quantificação de Microorganismo

	Diferenças entre amostras			χ^2 (2)
	A (n= 16) <i>Ordem Média</i>	B (n= 15) <i>Ordem Média</i>	C (n= 14) <i>Ordem Média</i>	
Contagens totais a 30°C	9,94	26,97	33,68	26,47**
Enterobactérias	10,78	30,23	29,21	21,54**
Leveduras	11,66	28,37	30,21	18,68**
<i>Pseudomonas</i> spp.	10,25	26,5	33,82	25,67**

** $\rho < ,001$

6. Discussão

Sabemos que os VMP são mais perecíveis pois são submetidos a processos que causam alterações na sua estrutura física, e estes não são submetidos a um processo de tratamento térmico antes do consumo, isto pode favorecer a contaminação por microrganismos de alteração e patogênicos, que diminuem a qualidade e o tempo de vida útil dos alimentos e comportem mais perigos e riscos microbiológicos (Jeddi *et al.*, 2014). Neste sentido consideramos a importância do controle das etapas de processamento dos produtos, a manutenção das temperaturas desde a produção, durante a cadeia de distribuição até aos pontos de vendas/expositores (Mahajan, Luca & Edelenbos, 2014; EMBRAPA, 2011).

No que respeita ao estudo efetuado sobre os pré requisitos associados as zonas de exposição e venda dos produtos, quanto ao item “Limpeza dos equipamentos, tendo em atenção a acumulação de gelo”, verificamos que 13,3% apresentavam sinais de descongelação, quando o equipamento apresenta estes sinais, o equipamento pode não estar funcionando corretamente e provavelmente terá flutuações de temperatura, e a água em equipamentos de frio favorece a sobrevivência e a multiplicação de *Listeria monocytogenes* que é um potencial perigo para as embalagens (USDA, 2016). Basicamente é fundamental que o equipamento de frio (expositor) esteja visivelmente limpo.

Com relação aos itens “Limpeza aparente das prateleiras” e “Estado de conservação das prateleira”. Refere-se que é importante a manutenção dos equipamentos e a remoção da sujidade nas prateleiras, para prevenir a possível formação de biofilmes. A formação de biofilmes ocorre em virtude do acumulo de matéria orgânica, deposição e adesão de microrganismos em uma superfície de contato, a qual se fixam, constituem e iniciam a sua multiplicação. Estes representam uma preocupação para indústria de alimentos pois potencialmente resistem a tratamentos antimicrobianos e desinfetantes, além de causar deterioração, perda de qualidade ou veiculação de agentes patogênicos (Kasnowski *et al.*, 2010; McLandsborough, 2015). Os teores que o referido microrganismo pode atingir são preocupantes uma vez que sendo psicrófilos são capazes de multiplicar-se a baixas temperaturas (Rosado *et al.*, 2006).

Finalizando os itens da *checklist* a “Estiva correta”, todas as superfícies de vendas apresentavam estiva inadequada com os produtos fora da cortina de frio, as

prateleiras não estavam arrumadas, existiam géneros alimentícios que não pertenciam a gama de produtos MP e as mesmas expunha excesso de carga nas prateleiras levando ao empilhamento das embalagens, isto provoca consequências negativas para a circulação de ar frio nos equipamentos, comprometendo a temperatura dos alimentos neles armazenados e expondo-os a temperaturas elevadas (FDA, 2013; USDA, 2016).

Idealmente, a faixa de temperatura indicada para as câmaras de armazenamento varia de 0 à 2°C (USDA, 2016), as temperaturas encontradas neste estudos variaram em torno de -2,7 e 5,3°C. As temperaturas abaixo de zero podem causar queimaduras pelo frio, denominadas de *chilling injury* ou *cooling injury*, estas ocorrem quando os produtos são expostos a temperaturas inferiores à temperatura mínima de segurança. Mesmo se houver o congelamento da célula, a exposição das hortaliças a temperaturas baixas por um determinado período de tempo pode causar uma série de modificações no metabolismo normal, os quais reduzem a sua qualidade (Oliveira & Santos, 2015). Convém garantir que os alimentos são armazenados a uma temperatura inferior à temperatura mínima a que a maioria dos microrganismos patogénicos se multiplica. A razão de ser recomendado que o frigorífico esteja a cerca de 4°C está no facto de muitos dos microrganismos terem temperaturas mínimas de crescimento entre 6 e 10°C, o que significa que se, a temperatura do frigorífico subir acima da temperatura recomendada, podem-se criar condições para o desenvolvimento microbiano (ASAE, 2016). No entanto e apesar da temperatura do mostrador ser a correta, as temperaturas dos alimentos eram muito elevadas, e por isso, os mostradores não correspondem à realidade da temperatura no alimento e com isto cria-se uma falsa sensação de segurança tanto para o operador económico como para o consumidor.

As temperaturas observadas nas embalagens dos VMP variaram entre 3,7°C e 14,8°C. Apenas 4% das amostras analisadas estavam dentro do intervalo de segurança recomendado e 96% apresentavam temperaturas acima do limite superior recomendado (4°C), de modo geral as temperaturas encontradas estavam muito acima da faixa de segurança. Por outro lado nas embalagens dos VMP analisadas a recomendação indicada pelo produtor para a conservação está no intervalo de temperatura de 1°C e 4°C. O que significa que a temperatura recomendada pelo produtor não é assegurada pelo retalhista.

O CAC/RCP 1, (2003) diz que se a temperatura de refrigeração ultrapassar frequentemente os limites críticos, pode ser devido a um armazenamento em

quantidade superior à capacidade do equipamento (CAC/RCP 1, 1969/ Rev. 4, 2003).

A variação de temperatura em 5°C pode levar a duplicação ou triplicação da taxa de crescimento de eventuais agentes patogênicos de origem alimentar (Maistro *et al.*, 2012). Vários estudos têm mostrado que agentes patogênicos, tais como Salmonella e *E. coli* O157:H7 podem crescer em vegetais prontos para comer armazenados à temperatura perto de 10°C. Koseki & Isobe (2005) relataram um aumento da taxa de crescimento de Salmonella e *E. coli* O157:H7 em alface minimamente processada entre 4 e 7 vezes, com o aumento de temperatura de 10 a 15°C. Segundo Rocha *et al.*, (2014) existe um potencial para proliferação rápida de organismos mesófilos, que apresentam taxa de crescimento pronunciada a 12°C, resultando na deterioração precoce do produto. Tsironi *et al.*, (2016) verificou que o tempo de armazenamento de VMP em temperaturas mais altas resultaram em uma taxa de deterioração mais elevadas quando comparados com taxa de deterioração de temperaturas de armazenagem mais baixas. Ou seja, quanto mais exposto os produtos são à temperaturas elevadas, menor tempo de prateleira eles terão (FDA, 2013).

Os resultados obtidos para contagens totais 30°C compreendem-se entre $4,7 \times 10^4$ a $5,7 \times 10^8$ ufc/g, verificou-se que os resultados evoluíram conforme o expectável com as contagens de AmC a serem superiores as contagens de AmA. Do total das amostras, 40,0%, atingiu valores “Não satisfatórios” (contagens superiores a 10^6 ufc/g – valor de referência INSA). Koro *et al.*, (2010) também relataram contagens totais superiores a 10^6 ufc/g (6,2 a 6,7 log ufc/g em saladas prontas para comer. As contagens elevadas podem sugerir problemas de qualidade e têm como possíveis causas a refrigeração inadequada e um elevado período de exposição a temperatura inadequada (abuso de tempo/ temperatura). Isto tenderá a limitar o seu período de vida, como a deterioração pode ocorrer de forma relativamente rápida e geralmente será visível (Food Safety Whatch, 2009).

Nas correlações entre a temperatura das embalagens e a quantificação de microrganismos, houve uma correlação significativa positiva entre as temperaturas das embalagens e as Contagens totais a 30°C nas AmA, ou seja, quanto mais elevadas as temperaturas maior a quantificação de microrganismos.

Quanto as correlações entre a proximidade da data de consumo e as contagens de microrganismos, as Contagens totais a 30°C possuem uma correlação negativa significativa, ou seja, houve uma associação entre a aproximação da data de consumo e as quantificação de microrganismos, quanto mais próxima a DLC do produto

maiores são as quantificações de microrganismos. Jackson, *et al.*, (2013) em um estudo sobre determinação dos agentes microbiológicos e a avaliação qualidade microbiológica de saladas prontas para consumir, utilizando métodos dependentes e independentes de cultura, verificaram que não houve correlação significativa entre a data de consumo e quantificação de microrganismos.

No que se respeita as contagens das *Enterobacteriaceae*, essas variaram entre $9,0 \times 10^1$ a $8,9 \times 10^6$ ufc/g sendo que as AmC apresentaram valores mais elevados se comparadas com as AmA. Registamos 31,1% de resultados “Não satisfatórias”. Cardamone *et al.*, (2015) em um estudo sobre a avaliação da qualidade microbiológica dos VMP à venda na Sicília, Itália, encontraram resultados semelhantes entre 2 e 6 log ufc/g.

Mesmo que os teores destes indicadores encontrados no presente estudo tenham sido altas ($> 10^3$ ufc/g – valor de referência INSA), esses são microrganismos comuns em vegetais crus e não estão necessariamente associadas à contaminação fecal (Castro-Ibáñez *et al.*, 2016). Apesar de a conotação fecal deste parâmetro ser baixa, a verdade é que ela do ponto de vista conceitual existe. Muitas das *Enterobacteriaceae* são considerados flora normal neste tipo de produtos, e, portanto, têm provado não ser um indicador de contaminação fecal e patogênica de VMP, mas eles podem comprometer a qualidade sensorial e nutritiva (Santos *et al.*, 2012). Contagens altas desses microrganismos indicam uma deficiente higiene, falhas no processo de desinfecção (Health Protection Agency, 2009).

O resultado das análises microbiológicas das VMP deste estudo apontaram ausência de *E. coli*, sendo assim todas as amostras estavam “Satisfatórias”. A ausência de *E. coli* patogênicas no produto final esta de acordo com estudos anteriores realizados sobre a qualidade microbiológica de VMP em diferentes países, no Brasil, Alves *et al.*, (2010); em Portugal, Santos *et al.*, (2012); no Irão, (Jeddi *et al.*, 2014) e na Espanha (Castro-Ibáñez *et al.*, 2016).

A *E. coli*, é considerado o melhor indicador de contaminação fecal, o que poderia explicar a sua inclusão nos critérios de higiene dos processos para estes produtos pela legislação europeia e uma vez que a matéria fecal pode conter microrganismos patogênicos de origem entérica (Santos *et al.*, 2012).

Quanto a classificação dos Bolores nenhuma das amostras apresentou-se “Não satisfatórias”, sendo 97,8% “Satisfatórias” e 2,2% “Aceitável” com valores inferiores ou iguais a 10^2 ufc/g. Acevedo, Mendoza, & Oyón, (2001) detectaram quantificação

superior a quantificação de bolores encontrados nesse estudo, nos níveis de $4,5 \times 10^4$ ufc/g em amostras de salada prontas para o consumo.

Para a classificação de Leveduras, assim como Bolores todas amostras estavam dentro dos limites aceitáveis. Sendo 53,3% “Satisfatórias” e 46,7% valores inferiores ou iguais a 10^4 ufc/g. Houve uma ligeira progressão dos valores entre as AmA, AmB e AmC em uma a duas ordens de magnitude logarítmica. Em contraste com o presente estudo, Badosa *et al.*, (2008) relataram que as contagens de bolores e leveduras na maioria das amostras de vegetais, foram de 4 a 7 ufc log/g. Apesar destes organismos, apresentarem baixas quantificações nas amostras analisadas neste estudo, estes podem aumentar rapidamente e causar deterioração em curto espaço de tempo (Acevedo, Mendoza, & Oyón, 2001).

No que se respeita as *Pseudomonas* spp., os valores das contagens variaram entre $6,0 \times 10^4$ e $2,2 \times 10^8$ ufc/g. Tsironi *et al.*, (2016) também, encontrou contagens elevadas para *Pseudomonas* spp. entre 7,82 a 8,37 log ufc/g em VMP. Foram os microrganismos que mais se destacaram com resultados “Não satisfatório” neste estudo. *Pseudomonas* tem sido relatado como o gênero mais prevalente em VMP (Jackson *et al.*, 2013; Lopez-Velasco *et al.*, 2011; Tsironi *et al.*, 2016). *Pseudomonas* são bactérias que se caracterizam por produzir alterações organolépticas importantes, nomeadamente ao nível do cheiro, do sabor, da textura e cor (esverdeado acastanhado) (Food Safety Whatch, 2009). Sendo bactérias psicrotróficas são agentes importantes de deterioração de VMP e produtos armazenados no frio, constituindo a microbiota predominante após alguns dias de armazenamento (Costa *et al.*, 2009).

Nas correlações entre a temperaturas das embalagens e as quantificação dos microrganismos as *Pseudomonas* spp. nas AmA tiveram uma correlação marginalmente significativa positiva ($\rho = ,057$) considerando o valor da probabilidade, $\rho < ,05$. Houve uma correlação negativa significativa entre as temperaturas das embalagens e a quantificação de *Pseudomonas* spp. nas AmC, quanto menor as temperaturas das embalagens maior as contagens de *Pseudomonas* spp., este resultado poderá depender que houve alguma falha no processo de produção, possivelmente nas operações de lavagem e desinfecção da matéria-prima ou estes produtos podem ter passado por uma quebra na cadeia de refrigeração. Visto que são bactérias de origem aquática a centrifugação pode ajudar a reduzir, por outro lado as oscilações de temperatura verificadas nas embalagens podem contribuir para a

condensação no interior das embalagens e com isso ficar facilitada a proliferação microbiana.

As contagens de microrganismos psicotróficos foram tão elevadas quanto as contagens de mesófilos. Abadias *et al.*, 2008 encontrou resultados semelhantes em um estudo realizado na Espanha com VMP, onde os números de mesófilos presente era muito semelhante ao dos psicotróficos. As contagens de mesófilos e psicotróficos podem ser de semelhante magnitude no momento do processamento, o armazenamento refrigerado geralmente seleciona a favor do crescimento de microrganismos psicotróficos, incluindo as *Pseudomonas* spp. No entanto, os microrganismos mesófilos podem continuar a crescer a baixa temperatura, com as taxas de crescimento reduzidas (Abadias *et al.*, 2008).

Apesar das elevadas contagens deste microrganismos os VMP estudados não apresentavam quaisquer sinais visíveis de deterioração. Em uma revisão de Ragaert *et al.*, (2007), concluiu-se que contagens microbianas que produzem mudanças nos fatores de qualidade sensorial dos VMP, resultando em rejeição do produto são na maioria dos casos 7 a 8 log ufc/g. No entanto, excedendo este limite microbiológico nem sempre resulta na ocorrência de defeitos visuais (Ragaert *et al.*, 2007).

As amostras que apresentaram uma percentagem de mais “Não satisfatórias” são aquelas que apresentam mais um tipo de vegetal na mesma embalagem (AmB e AmC). Seo *et al.*, (2010) em um estudo onde foram testadas à distribuição de microrganismos e à presença de bactérias patogénicas em VMP comercializadas em lojas de departamento, supermercados e um restaurantes em Seul, Coréia, observou que as contagens microrganismos de saladas mistas (6,8 a 9,7 log ufc/g) foram mais elevadas que as contagens de microrganismos em alfaces (3,0 a 8,1 log ufc/g).

Se uma embalagem contiver mais de uma variedade de vegetais de diferentes proveniências pode haver tempo de espera do produto em armazenagem, e isto, pode produzir eventualmente diferenças na qualidade microbiológica, embalagens com mais um vegetal necessitam de um tempo maior no processamento. A eficácia dos tratamentos de desinfecção pode ser diferente, os procedimentos podem não ser tão eficazes quanto os que têm uma só variedade. Deve-se ter em consideração que o controlo de todos os processos de produção devem ser reforçados, principalmente ao que se respeita o controlo das temperaturas e o tempo de processamento.

Analisando a classificação do produto final, verificou-se que os resultados evoluíram conforme o expectável, houve um aumento do número de microrganismos

de acordo com o aumento do número de variedades de vegetais nas embalagens. Ou seja, as contagens das AmC foram mais elevadas que as contagens de AmB que conseqüentemente foram mais elevadas que as AmA. 64,4% dos resultados ultrapassam os limites estabelecidos (Santos *et al.*, 2005).

Nas comparações entre os tipos de amostras, AmA, AmB e AmC e as contagens de microrganismos por parâmetros, concluímos que há diferenças significativas entre os tipos de amostra e as contagens de microrganismos em todos os grupos comparados à exceção do parâmetro Bolores. Os testes de *Mann-Whitney* com Correção de *Bonferroni* evidenciaram diferenças significativas entre as AmA e AmB, e ainda foram evidenciadas diferenças significativas entre as AmA e AmC. Não houve diferenças significativas entre as AmB e AmC para todos os grupos em comparação. Com esses resultados podemos notar que quanto maior a variedade de vegetais nas embalagens maior a quantidade de microrganismos. No estudo realizado por Oliveira *et al.*, (2011) sobre qualidade microbiológica de VMP observou-se o mesmo padrão, contagens mais elevadas para saladas mistas (9,3 log ufc/g) e contagens reduzidas para alfaces (7,1 log ufc/g).

Sintetizando alguns aspectos discutidos, salientamos aqueles que entendemos serem fatores de elevada importância. As superfícies de vendas de saladas prontas a consumir deverão seguir alguns requisitos de forma que se possa garantir a qualidade dos produtos que comercializam, tais como: Assegurar a boa manutenção dos equipamentos de refrigeração, para controle mais eficaz das temperaturas; Implementar regras de armazenamento adequado (Estiva correta), assegurando a correta temperatura das câmaras frigoríficas e a circulação do ar; É importante se fazer uma revisão das Boas Práticas, uma vez que se observou que os expositores são um fator de risco muito importante, pois as embalagens dos VMP apresentavam temperaturas muito elevadas e estas devem ser mantidas a temperaturas corretas.

É respeitável que os consumidores compreendam a importância de qualquer informação sobre o produto e que sigam quaisquer instruções que acompanhem os produtos, e que tomem decisões esclarecidas. Em especial, os consumidores devem ser informados das relações entre o controle do tempo e da temperatura e as doenças com origem nos alimentos.

Este estudo tem como aspecto limitante o número restrito de amostras sendo assim não se pode inferir para a população, os resultados são apenas indicativos de uma tendência de comportamento.

7. Conclusão

O primeiro objetivo deste estudo foi avaliar os fatores de risco à saúde humana relativos ao consumo de saladas embaladas prontas para consumir. Conclui-se que a qualidade microbiológica destes produtos necessita ser melhorada, sobretudo nos produtos que têm mais variedades de folhas. 64,4% dos resultados ultrapassam os limites estabelecidos, destes 96,6% eram de VMP com três ou mais variedades folhas na mesma embalagem. Ou seja produtos com mais variedades de folhas na mesma embalagem apresentavam diferentes características do ponto vista microbiológico do que as que continham menos variedades. Estes resultados expressam possíveis falhas na cadeia de processamento e armazenamento.

Em termos de pré-requisitos a maior parte dos equipamentos estavam em boas condições, no entanto a estiva deve ser melhorada pois a grande maioria das amostras estudadas apresentavam temperaturas de armazenamento estavam acima do recomendado pelo fabricante (1 - 4°C). É importante ter um controlo mais rigoroso das temperaturas caso contrario o tempo de vida útil do produto deve ser reduzido.

O parâmetro que evidenciou mais resultados “Não satisfatórios” foram as *Pseudomonas* spp. sabemos que essas são as principais bactérias que causam deterioração nos VMP. Por serem psicrotróficas se adaptam bem ao frio e aos produtos vegetais e podem se desenvolver durante a comercialização quando não são armazenados à temperatura recomendada pelo fornecedor, do que propriamente as contagens de mesófilos totais.

A segurança alimentar dos VMP é uma questão de crescente preocupação. Neste contexto, os VMP expostas as condições avaliadas podem constituir um perigo para a saúde dos consumidores. Este é o aspecto do sector destes produtos que realmente precisa de atenção devido a magnitude do risco em potencial.

De acordo com os resultados obtidos, podemos constatar que esses produtos necessitam de um controlo de qualidade mais eficaz para que os consumidores que estão cada vez mais interessados nesse tipo alimento tenham certeza de que consomem produtos seguros do ponto vista microbiológico.

Os resultados do presente estudo sugerem a necessidade de que sejam feitas investigações similares, abrangendo um número maior de amostras, buscando assim um entendimento mais amplo das reais condições dos alimentos oferecidos à população e conseqüentemente um nível mais elevado de segurança.

Deve-se verificar quais fatores influenciam potencialmente a qualidade final de VMP, principalmente aqueles cuja as embalagens contêm mais de um tipo de vegetal e relaciona esses fatores com a contaminação, tempo e temperatura de armazenamento e de exposição.

É recomendável a realização de mais estudos para conhecer melhor as características desse tipo produto, importância e a influência do controle de qualidade, sendo que, seria interessante repetir o estudo com um número maior de amostras, para verificar se as observações do presente estudo seriam confirmadas.

Referencias Bibliográficas

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

Abadias, M. *et al.*, (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 121–129.

Acevedo, L., Mendoza, C., & Oyón, R. (2001). Total and fecal coliforms, some enterobacteria staphylococcus sp. and moulds in salads for hot dogs sold in Maracay, Venezuela. *PubMed*, 51, 366-370.

Alves, J. *et al.*, (2010). Qualidade de produto minimamente processado à base de abóbora, cenoura, chuchu e mandioquinha-salsa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 625-634.

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (2016). *ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica*. Acesso em 29 de October de 2016, disponível em ASAE: <http://www.asae.pt>

Badosa, E. *et al.*, (2008). Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 605–611.

Baptista, P., & Venâncio, A. (2003). *Os Perigos para a Segurança Alimentar no Processamento de Alimentos* (Vol. 1). (L. Forvisão, Ed.) Guimarães, Portugal.

Beuchat, L. R. *et al.*, (2001). Standardization of a Method To Determine the Efficacy of Sanitizers in Inactivating Human Pathogenic Microorganisms on Raw Fruits and Vegetables. *Journal of Food Protection*, 64 (7), 1079–1084.

CAC/RCP 1-1969. (2003). *Codex Alimentarius Commission. General Principles of Food Hygiene* (Vol. 4). Rome: FAO/OMS.

CAC/RCP 53. (2003). *Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables*. (C. A. Commission, Ed.) Rome: FAO/OMS.

Callejón, R. M. *et al.*, (2015). *Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes*. (Vol. 12). Foodborne Pathogens and Disease.

Campbell-Platt, G. (2015). *Ciência e tecnologia de alimentos* (Vol. 1). Barueri, SP, Brasil: Editora Mnole Ltda.

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.

Castro-Ibáñez, I. *et al.*, (2016). Identification of sampling points suitable for the detection of microbial contamination in fresh-cut processing lines. *Food Control* (0956-7135), 841-848.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (2008). *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*. USA.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (8 de July de 2011). *E.coli (Escherichia coli)*. (O. o.-p. UPDATE), Produtor) Acesso em 11 de October de 2016, disponível em CDC - Centers for Disease Control and Prevention: <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/travel-germany-7-8-11.html>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (23 de March de 2012). *Multistate Outbreak of E. coli O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce (FINAL UPDATE)*. Acesso em 3 de October de 2016, disponível em CDC - Centers for Disease Control and Prevention: <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/romaine-lettuce-3-23-12.html>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (1 de August de 2014). *Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O121 Infections Linked to Raw Clover Sprouts (Final Update)*. Acesso em 19 de October de 2016, disponível em CDC - Centers for Disease Control and Prevention: <http://www.cdc.gov/ecoli/2014/o121-05-14/index.html>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (22 de December de 2015). *Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 Infections Linked to Costco Rotisserie Chicken Salad (Final Update)*. Acesso em 19 de October de 2016, disponível em CDC - Centers for Disease Control and Prevention: <http://www.cdc.gov/ecoli/2015/o157h7-11-15/index.html>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (11 de December de 2013). *Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 Infections Linked to Ready-to-Eat Salads (Final Update)*. Acesso em 19 de October de 2016, disponível em CDC - Centers for Disease Control and Prevention: <http://www.cdc.gov/ecoli/2013/O157H7-11-13/index.html>

CFIA - Canadian Food Inspection Agency. (18 de October de 2014). *Minimally Processed Ready-to-Eat Fruit and Vegetables*. Acesso em 11 de October de 2016, disponível em Canadian Food Inspection Agency: <http://www.inspection.gc.ca/food/fresh-fruits-and-vegetables/food-safety/minimally-processed-ready-to-eat-fruit-and-vegetab/eng/1413673339210/1413673388676?chap=0>

Correia, C. B. *et al.*, (2015). Análise de dados microbiológicos de gêneros alimentícios prontos a comer servidos no ano de 2013 em unidades de restauração coletiva. *Boletim Epidemiológico*, 13-17.

Costa, W. A. *et al.*, (2009). Biocontrole de *Listeria monocytogenes* por *Pediococcus acidilactici* em couve minimamente processada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29 (4), 785-792.

Directiva 2000/13/CE. (2000). relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 29-42.

Duff & Phelps. (2016). *Food Retail Industry Insights*. EUA: Copyright © 2016 Duff & Phelps LLC. All rights reserved.

EFSA. (2014). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in leafy greens eaten raw as salads). *EFSA Journal*, 11, 3600.

EFSA/ECDC. (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 3547.

Elviss, N. C. *et al.*, (2009). Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 83-88.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2006). *Frutas Minimamente Processadas: Aspectos de Qualidade e Segurança* (1 ed.). Fortaleza, CE, Brasil: EMBRAPA.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2011). *Processamento mínimo de frutas e hortaliças. Tecnologia, qualidade e sistemas de embalagem* (1 ed.). Rio de Janeiro, RJ, Brasil: EMBRAPA.

European Commission. (14 de Julho de 2016). *Press Release Database*. Acesso em 14 de Outubro de 2016, disponível em European Commission: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-16-2525_pt.htm

FAO - Food and Agriculture Organization. (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.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (18 de August de 2016). *Codex Alimentarius, Normas Internacionales de los Alimentos*. Acesso em 12 de October de 2016, disponível em Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/>

FDA - Food and Drug Administration. (2013). *Food Code, United States Public Health Service, FDA*. Alexandria, EUA: U.S. Department of Commerce National Technical Information Service.

FDA - U.S. Food and Drug Administration. (25 de february de 2008). *Search for FDA Guidance Documents*. Acesso em 11 de october de 2016, disponível em <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm064458.htm>

Food Safety Whatch. (28 de January de 2016). *Can pre-packed salads ever be completely safe?* Acesso em 17 de October de 2016, disponível em Food Safety

Whatch, The Science of Safe Food: <http://www.foodsafetywatch.org/blog/can-pre-packed-salads-ever-be-completely-safe/>

Food Safety Whatch. (27 de February de 2009). *SALAD DAYS – an investigation into the microbiological safety of prepared salads*. Acesso em 17 de October de 2016, disponível em Food Safety Whatch, The Science of Safe Food: <http://www.foodsafetywatch.org/features/salad-days-an-investigation-into-the-microbiological-safety-of-prepared-salads/>

Gil, M. I. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 37-45.

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*, 453-468.

Hanson, L. A. *et al.*, (2012). Estimating global mortality from potentially foodborne diseases: an analysis using vital registration data. *Population Health Metrics*, 10 (5), 1-7.

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.

IBIS World - Industry Market Research International. (2016). *IBISWorld Industry Report, Global Fruit & Vegetables Processing*. EUA: IBISWorld.

IFPA - International Fresh-cut Produce Association. (2015). Acesso em 25 de Outubro de 2015, disponível em <http://www.fresh-cuts.org>

Ilyas, S. *et al.*, (2016). Multidrug-resistant pathogens isolated from ready-to-eat salads available at a local market in Pakistan. *British Food Journal*, 118 (8), 2068-2075.

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2005-2006). *Resultados da Avaliação das Condições de Higiene na Restauração Coletiva 2005-06*. (C. d. Nutrição, Ed.) Lisboa, Portugal: INSA.

ISO 22000. (2005). *Sistemas de gestão da segurança alimentar Requisitos para qualquer organização que opere na cadeia alimentar*. Monte de Caparica, Portugal: Instituto Português da Qualidade.

ISO 7218. (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations*.

Issa-Zacharia, A. e. (2010). A review of microbiological safety of fruits and vegetables and the introduction of electrolyzed water as an alternative to sodium hypochlorite solution. *African Journal of Food Science*, 4, 778-789.

Jackson, C. *et al.*, (2013). Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. *Bio Med Central Microbiology*.

Jeddi, Z. M. *et al.*, (2014). Microbial Evaluation of Fresh, Minimally-processed Vegetables and Bagged Sprouts from Chain Supermarkets. *Journal of Health, Population and Nutrition (JHPN)*, 32 (3), 391-399.

Kasnowski, M. C. *et al.*, (2010). Formação de Biofilme na Industria de Alimentos e Métodos de Validação de Superfícies. *Revista Científica Eletrônico de Medicina Veterinária*, 15, 1679-7353.

Koro, M. E. *et al.*, (2010). Microbial Quality of Food Available to Populations of Differing Socioeconomic Status. *American Journal of Preventive Medicine*, 38 (5), 478-481.

Koseki, S., & Isobe, S. (2005). Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *International Journal of Food Microbiology*, 104 (3), 239–248.

Lidon, F., & Silvestre, M. M. (2010). *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana* (Vol. 1). Lisboa, Portugal: Escolar Editora.

Little, C., & Gillespie, I. (2008). Prepared salads and public health. *Journal of Applied Microbiology*. 105, 1729-1743.

Lopes, F. *et al.*, (2012). E. coli: uma doença em notícia em discursos de incerteza e contradição. *Observatorio (OBS*) Journal*, vol.6 (nº1), 159-181.

Lopez-Velasco, G. *et al.*, (2011). Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *Journal of Applied Microbiology*, 110 (5), 1203–1214.

Mahajan, P., Luca, A., & 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. *et al.*, (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.

Mantilla, S. P. *et al.*, (2010). Atmosfera modificada na conservação de alimentos. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 8, n. 4, (0103-989X), 437-448.

Martins, C. (2011). *Manual de Análise de Dados Quantitativos com Recurso ao IBM®SPSS®, Saber Decidir, Fazer, Interpretar e Redigir* (Vol. 1). Braga, Portugal: Psiquilibrios Edições.

McLandsborough, L. A. (2015). Current Knowledge and Perspectives on Biofilm Formation and Remediation. *Biofilms in the Food Environment*, 2.

Ministério da Saúde. (2014). *Guia Alimentar para a População Brasileira* (2 edição). Brasília, DF, Brasil: Ministério da Saúde.

Moreira, M. R. *et al.*, (2006). Ascorbic Acid Retention, Microbial Growth, and Sensory Acceptability of Lettuce Leaves Subjected to Mild Heat Shocks. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 71, 188-192.

NGA - Nacional Grocers Association. (2015). *Supermarket Guru Consumer Survey Report*. Chicago, EUA: Nacional Grocers Association .

NP 3277-2. (1987). *Microbiologia Alimentar - Regras gerais para a contagem de Bolores e Leveduras: método corrente*. Instituto Português da Qualidade.

NP 4137. (1991). *Microbiologia Alimentar - Regras gerais para a determinação de Enterobacteriaceae sem revitalização*. Instituto Português da Qualidade.

NP 4396. (2002). *Microbiologia Alimentar - Regras gerais para a contagem de Escherichia coli: método corrente*. Instituto Português da Qualidade.

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

Oliveira, E. N., & Santos, D. C. (2015). *Tecnologia e processamento de frutos e hortaliças* (Vol. 1). Natal, RN, Brasil: Editora do IFRN.

Oliveira, M. A. *et al.*, (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22, 1400-1403.

Oliveira, M. *et al.*, (2010). Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology*, 27, 679-684.

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.

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

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.

- Picoli, A. A. *et al.*, (2010). Avaliação de biorreguladores no metabolismo secundário de beterrabas inteiras e minimamente processadas. *Bragantia*, 69 (4), 983-988.
- PHE - Public Health England. (11 de August de 2016). *Information on the national outbreak of E. coli O157 which has now been declared over*. Acesso em 17 de October de 2016, disponível em GOV.UK: <https://www.gov.uk/government/news/update-as-e-coli-o157-investigation-continues>
- Picoli, A. A. (2010). Avaliação de biorreguladores no metabolismo secundário de beterrabas inteiras e minimamente processadas. *Bragantia*, 69 (4), 983-988.
- Quivy, R., & V., C. L. (1998). *Manual de Investigação em Ciências Sociais* (2 ed ed.). Lisboa, Portugal: Gradiva.
- Ragaert, P. *et al.*, (2007). Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 185–194.
- Rajwar, A. *et al.*, (2015). Microbiology of Fresh Produce: Route of Contamination, Detection Methods and Remedy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1.
- Regulamento (CE) 2073. (2005). *Relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios* (Vol. 338/1). (C. d. Europeias, Ed.) Bruxelas: Jornal Oficial da União Europeia.
- Regulamento (CE) N. 178. (2002). *Que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios*. (P. E. Conselho, Ed.).
- Regulamento (CE) N.1441. (5 de Dezembro de 2007). Que altera o Regulamento (CE) N. 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Rentokil. (January de 2016). *Segurança Alimentar*. (N. e. Alimentar, Produtor) Acesso em 13 de October de 2016, disponível em Rentokil: <http://www.rentokil.pt/seguranca-alimentar/normas-e-regulamentos-de-seguranca-alimentar/>
- Rocha, G. G. *et al.*, (Dezembro de 2014). *Ciências Biológicas*. (S. M. Costa, Ed.) Acesso em 26 de Outubro de 2015, disponível em Revista UniVap On-Line: <http://dx.doi.org/10.18066/revunivap.v20i36.212>
- Rosado M. S. *et al.*, (2006). Modelagem do processo de formação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável, granito e mármore e avaliação das microtopografias dessas superfícies por microscopia eletrônica de varredura. *Higiene Alimentar*, 21 (150), 119-120.
- Santos, J. S., & Oliveira, M. B. (2012). Revisão: Alimentos frescos minimamente processados embalados em atmosfera modificada. *Brazilian Journal Food Technology*, v. 15, n. 1, 1-14.

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

Santos, M. I. *et al.*, (Março/Abril de 2005). Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Revista da Ordem dos Farmacêuticos*, 64:66-8.

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

SCF - Scientific Committee on Food. (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.

Seo, Y.-H. *et al.*, (2010). Microbial Evaluation of Minimally Processed Vegetables and Sprouts Produced in Seoul, Korea. *Food Sci. Biotechnol*, 19 (5), 1283-1288.

Sousa, M., & Alves, M. (2008). Atmosferas Modificadas, Evolução na conservação de produtos alimentares. *SEGURANÇA E QUALIDADE ALIMENTAR*, Ano 3 (N.4), 40-43.

Tsironi, T. *et al.*, (2016). Shelf-life prediction models for ready-to-eat fresh cut salads: Testing in real cold chain. *International Journal of Food Microbiology*, 1-10.

USDA - United States Department of Agriculture. (2016). *The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks*. Washington, EUA: USDA.

WHO - World Health Organization. (2003). *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases* (WHO technical report series; 916 ed.). Geneva, Switzerland: WHO Library.

WHO - World Health Organization. (15 de August de 2016). *No new cases in enterohaemorrhagic Escherichia coli outbreak in the United Kingdom*. Acesso em 20 de October de 2016, disponível em WHO - World Health Organization: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/food-safety/news/news/2016/08/no-new-cases-in-enterohaemorrhagic-escherichia-coli-outbreak-in-the-united-kingdom>

WHO - World Health Organization. (22 de September de 2011). *Outbreaks of E. coli O104:H4 infection: update 30*. Acesso em 20 de October de 2016, disponível em WHO-World Health Organization: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/food-safety/news/news/2011/07/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection-update-30>