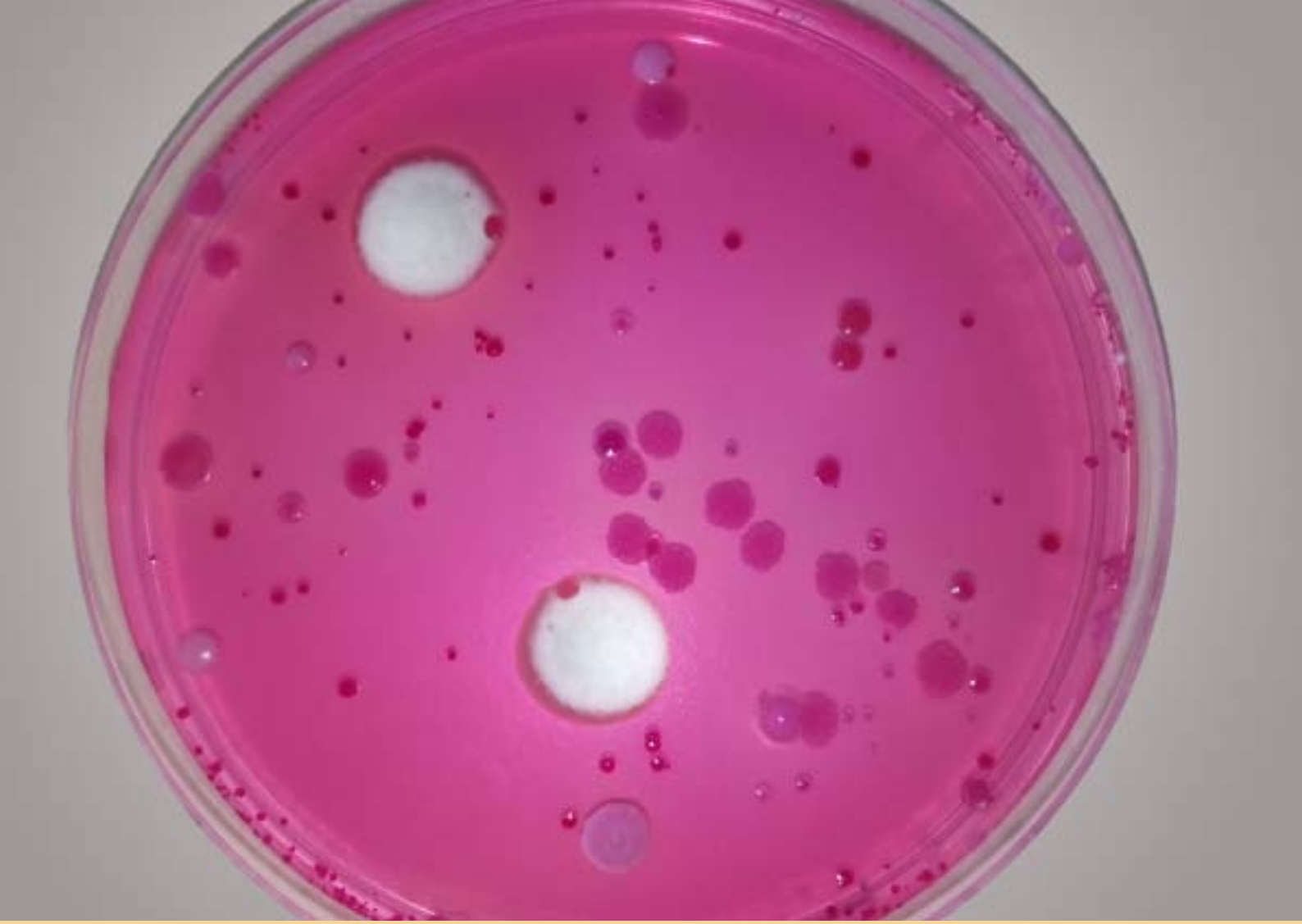

Jessica Lino Correia

Avaliação microbiológica de refeições servidas em Cantina Universitária

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Olga Cardoso e co-orientada pelo Professor Doutor Fernando Ramos e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro 2015

· U C ·

Universidade de Coimbra

Jessica Lino Correia

Avaliação microbiológica de refeições servidas em Cantina Universitária

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Olga Cardoso e co-orientada pelo Professor Doutor Fernando Ramos e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro 2015

· U C ·

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

O Mestrado foi facilitado pela ajuda de todos os que em seguida irei enunciar, por isso, quero deixar o meu agradecimento:

À Professora Doutora Olga Cardoso por ter aceite ser minha Orientadora e por toda a disponibilidade e compreensão.

Ao Professor Doutor Fernando Ramos por ter aceite ser meu Co-Orientador.

Ao Dr. João Veiga, do gabinete de Nutrição e Controlo Alimentar dos Serviços de Ação Social da Universidade de Coimbra, quero agradecer a oportunidade que me foi concedida de acompanhar o seu trabalho e pela simpatia, ajuda e acompanhamento prestado.

À Sandra Rodrigues, funcionária do Laboratório de Microbiologia da Faculdade, pela boa disposição e pelo bom ambiente de trabalho proporcionado.

A todos os colaboradores da Cantina Luzio Vaz pela colaboração prestada.

Por último, quero deixar um especial agradecimento aos meus pais e avó, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram incondicionalmente no meu percurso académico.

Índice

Agradecimentos 2
Índice 3
Índice de Tabelas 5
Índice de Figuras 5
Lista de Abreviaturas 6
Resumo 7
Abstract 8
1. Segurança Alimentar 9
2. Caracterização da atividade e enquadramento legal 11
3. Microbiologia dos alimentos 12
3.1 Microrganismos 12
3.1.1 Microrganismos indicadores 13
3.2 Fatores determinantes ao desenvolvimento de microrganismos 15
3.2.1 Fatores extrínsecos 16
3.2.2 Fatores intrínsecos 18
4. Contaminação dos alimentos 20
4.1 Contaminação biológica 20
4.1.1 Bactérias 22
4.1.2 Parasitas 29
4.1.3 Vírus 30
4.2 Contaminação química 32
4.3 Contaminação física 33
4.4 Fontes de contaminação 33
4.4.1 Água 33
4.4.2 Solo 34
4.4.3 Ar e poeiras 34
4.4.4 Manipuladores de alimentos 35
5. Doenças de origem alimentar 36
5.1 Doenças de origem alimentar em Portugal 37
5.2 Doenças de origem alimentar na Europa 39
6. Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) 39
6.1 Pré-requisitos 40
6.1.1 Instalações 40
6.1.2 Controlo de água 40
6.1.3 Resíduos 40
6.1.4 Controlo de fornecedores 40

6.1.5 Controlo de pragas 41
6.1.6 Plano de higienização 41
6.1.7 Formação 42
7. Etapas do processo de confeção de refeições 42
7.1 Recepção 42
7.2 Armazenagem 43
7.3 Descongelação 43
7.4 Condições gerais de preparação de alimentos 44
7.5 Exposição 46
7.6 Empratamento 47
8. Objetivos 48
9. Materiais e métodos 49
9.1 Materiais 49
9.2 Métodos 49
9.2.1 Definição do plano de amostragem 49
9.3 Avaliação microbiológica 53
9.3.1 Colheitas 53
9.3.2 Preparação das amostras para análise 54
9.3.3 Realização da análise microbiológica 54
10. Resultados e discussão 56
10.1 Estatística descritiva: caraterização da amostra em estudo 56
10.2 Análise comparativa: Relação entre as variáveis "contagem de microrganismos" e " tempos de recolha" 59
10.3 Avaliação da Qualidade Microbiológica das Preparações Culinárias 60
11. Conclusão 69
12. Bibliografia 70
13. Anexos 74

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Alguns tipos de microrganismos e respectivos pH ótimos de crescimento (Pinto e Neves, 2010). ... 18
Tabela 2 - Tipos de microrganismos e respetivas atividades de água mínimas para crescimento (Pinto e Neves, 2010). ... 19
Tabela 3 - Classificação dos microrganismos consoante o seu perigo e difusão. ... 21
Tabela 4 - Bactérias implicada em doenças de origem alimentar (ASAE, 2015). ... 22
Tabela 5 - Temperaturas mínimas e máximas de desenvolvimento de algumas bactérias (Baptista et al., 2003). ... 23
Tabela 6 - Parasitas envolvidos em doenças de origem alimentar (ASAE, 2015). ... 30
Tabela 7 - Vírus implicados em doenças de origem alimentar (ASAE, 2015). ... 31
Tabela 8 - Perigos químicos, alimentos e doenças associadas (ASAE, 2015). ... 32
Tabela 9 - Principais origens dos perigos físicos (Baptista e Linhares, 2003). ... 33
Tabela 10 - Surtos com agente etiológico identificado, 2009-2014 (Viegas, S. et al. 2015). ... 37
Tabela 11 - Temperaturas internas mínimas de segurança (Baptista et al., 2005). ... 46
Tabela 12 - Meios de cultura para a pesquisa de microrganismos. ... 49
Tabela 13 - Grupos de alimentos pronto a comer. ... 50
Tabela 14 - Designação das preparações culinárias recolhias para amostra. ... 50
Tabela 15 - Valores Guia para a avaliação microbiológica de alimentos prontos a comer (Santos, I, et al., 2005). ... 51
Tabela 16 - Níveis de Qualidade microbiológica de alimentos prontos a consumir (Santos, I. et al., 2005) ... 52
Tabela 17 - Número de amostras recolhidas por Grupo de alimento. ... 52
Tabela 18 - Estatística descritiva dos resultados obtidos das análises microbiológicas. ... 56
Tabela 19 - Classificação das amostras relativas ao parâmetro Microrganismos a 30°C. ... 60
Tabela 20 - Classificação das amostras relativas aos parâmetros Bolores e Leveduras. ... 62
Tabela 21 - Classificação das amostras relativas aos parâmetros Coliformes totais e *Escherichia coli.* ... 63
Tabela 22 - Classificação das amostras relativas ao parâmetro *Staphylococcus* com coagulase positiva. ... 65
Tabela 23 - Classificação das amostras por Grupo e tempos de recolha. ... 66
Tabela 24 - Classificação das amostras por Grupo de alimento. ... 67
Tabela 25 - Resultados obtidos no Estudo de análise de dados microbiológicos de géneros alimentícios prontos a comer servidos no ano 2013 em unidade de restauração, Correia, C. et al., 2015) ... 67
Tabela 26 - Amostras analisadas que apresentam valor superior ao aceitável e o parâmetro responsável. ... 68

Índice de Figuras

Figura 1 - Agentes causais de toxinfeções alimentares 2009-2013 (Viegas, S, et al., 2014). ... 38

Lista de Abreviaturas

ASAE - Autoridade de segurança alimentar e económica

BHI - Brain Heart Infusion

BSE - Encefalopatia espongiforme bovina

CAC - *Codex Alimentarius Commission*

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

EFSA - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação

HACCP - Hazard Analysis and Critical Control Point

ICMSF - Internacional Commission Microbiological Specifications for Foods

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

ISO - International Organization for Standardization

NP - Norma Portuguesa

°C - Grau Celsius

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCA - Plate Agar Count

PCB - Bifenilos policlorados

SPSS - Statistic Package for the Social Sciences

TBX - Tryptone Bile Glucuronide

UC - Universidade de Coimbra

Ufc - Unidades formadoras de colónias

VRBL - Violet Red Bile Agar

Resumo

A segurança alimentar nas cantinas escolares, bem como em qualquer estabelecimento de restauração, é um imperativo na medida em que a comercialização de refeições contaminadas pode ter um considerável impacto na saúde dos alunos e comunidade escolar enquanto utilizadores da cantina.

Com a finalidade de avaliar a qualidade microbiológica de refeições servidas, na cantina universitária Luzio Vaz, à comunidade universitária, foram recolhidas amostras dos pratos de carne e peixe (Grupo I – Alimentos cozinhados) e de saladas (Grupo III – Alimentos não cozinhados), num total de 78 amostras, não tendo sido recolhidas amostras do Grupo II. As amostras eram recolhidas, no mesmo dia, em tempos diferentes t0 (12h00) e t1 (14h00). Em seguida, no laboratório, a qualidade destas amostras foi avaliada relativamente aos seguintes critérios: contagem de microrganismos aeróbios a 30°C, contagem de bolores e leveduras, contagem de coliformes totais e fecais, contagem de *Escherichia coli* e *Staphylococccus aureus*.

De um modo geral, obtivemos uma elevada percentagem de amostras satisfatórias/aceitáveis para as refeições de carne e peixe, 90,38%, e para as saladas, 80,77%. A percentagem de não satisfatórios para as refeições de carne e peixe foi de 9,62% e para as saladas 19,23%.

Os resultados das análises microbiológicas foram comparados através do Teste T, não se verificando diferença entre as amostras recolhidas em t0 e t1, em nenhum dos critérios analisados, para um nível de significância de 5%.

Perante os resultados obtidos, concluiu-se que as refeições apresentam qualidade microbiológica, não apresentando qualquer perigo para o consumidor. Estes resultados remetem para o cumprimento das boas práticas de fabrico por parte dos manipuladores de alimentos.

Palavras-chave: Qualidade microbiológica, Segurança Alimentar, Microrganismos a 30°C, Bolores e Leveduras, Coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

Abstract

The food safety in school canteen, as well as any other catering establishment, is a must because the marketing of contaminated meals can have a significant impact in students' and school community's health as canteen clients.

In order to evaluate the microbiological quality of the meals served to the school community, at the Lúzio Vaz university canteen, were gathered seventy-eight samples of meat and fish dishes and salads. All of the samples were gathered in the same day but in different hours: t0 at 12 p.m. and t1 at 2 p.m. After the sample gathering, they were analyzed in the laboratory, following a few criteria: aerobic microorganism's couting at 30°C, molds and yeasts counting, total and fecal coliforms counting, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counting.

The results showed that, in a general way, we got a high percentage of acceptable/satisfactory, 90,38%, and for the salads, 80,77%. The unacceptable/unsatisfactory for the meat and fish dishes were 9,62% and for the salads were 19,23%.

The results of the microbiological analysis were compared through the T Test, and for a 5% significance level, there was no difference between the t0 and t1 samples, in any of the few criteria analyzed.

In the end, through analyzing the obtained results, it was possible to conclude that the meals present a good microbiological quality and do not represent any danger to the consumer. This results show the compliance with good manufacturing practice by the food manipulators.

Keywords: Microbiological Quality, Food Safety , microorganisms at 30 °C , Yeast and Molds, coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

1. Segurança Alimentar

Atualmente os consumidores encontram-se mais sensibilizados para a importância da segurança alimentar como elo fundamental para assegurar a sua saúde. A noção de que os perigos podem ser introduzidos em qualquer ponto da cadeia alimentar, a mediatização das ações de fiscalização, a maior preocupação dos consumidores com os aspetos da higiene alimentar e a mutação rápida dos estilos de vida da população, com um incremento no consumo de refeições fora de casa, têm também contribuído para esta crescente notoriedade (Fernandes, E. *et al*., 2012).

De acordo com o *Codex Alimentarirus* a segurança alimentar é a garantia de que os alimentos são preparados de acordo com as regras de higiene e manipulação dos alimentos, não provocando danos ao consumidor, desde que sejam preparados ou ingeridos de acordo com a utilização prevista.

A higiene dos géneros alimentícios segundo o Regulamento n° 852/2004 é definida como um conjunto de medidas e condições necessárias para controlar os perigos e assegurar que os géneros alimentícios são próprios para consumo. O mesmo regulamento estabelece que todos os operadores de empresas do setor alimentar, ao longo de toda a cadeia de produção devem garantir que a segurança dos géneros alimentícios não é comprometida. Esta legislação sobre a higiene dos géneros alimentícios, cujo principal objetivo é a proteção dos consumidores contra potenciais riscos para a saúde, vem conceder aos operadores um papel muito mais importante, com a responsabilidade acrescida de garantirem a higiene e segurança dos alimentos através da implementação de sistemas de autocontrolo (Novais, 2006).

De ter em conta a obrigatoriedade legal (segundo o Decreto-Lei n° 67/98) de aplicar sistemas de segurança alimentar (designados de sistemas de autocontrolo), baseados nos princípios do Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) em todas as empresas que preparem, fabriquem, transformem, embalem, transportem, distribuam, manipulem ou comercializem, independentemente da sua natureza ou dimensão.

O sistema de HACCP baseia-se em princípios e pré-requisitos pretendendo-se, identificar pontos ou etapas onde se podem controlar perigos e consequentemente controlar o processo de produção através da aplicação de medidas que permitam assegurar a inocuidade dos alimentos (Baptista e Antunes, 2005).

A comida que ingerimos não é estéril, comporta microrganismos conforme o grau de contaminação, condições de armazenagem e o tipo de alimento. Contudo, não apresenta nenhuma consequência para a saúde dos consumidores porque os microrganismos ou são inofensivos ou em número insuficiente para provocar danos. No entanto, uma contaminação excessiva e consequente exposição dos alimentos a condições propícias ao desenvolvimento de microrganismos contribui para o desenvolvimento de microrganismos patogénicos e, que por sua vez pode ultrapassar o patamar tolerável para o consumidor.

O setor da restauração coletiva (restaurantes, cafés, cantinas) é o mais associado a episódios de toxinfeções alimentares. Este facto pode ser explicado pela grande quantidade de refeições preparadas bastante tempo antes de serem consumidas e mantidas a temperaturas inadequadas (Lacasse, 1995).

Segundo Nunes e Breda (2001), é necessário garantir determinados princípios de higiene durante a preparação, confeção e armazenamento dos alimentos, a fim de eliminar quaisquer riscos de transmissão de infeção ou outras doenças de origem alimentar. Estes princípios dizem respeito à higiene pessoal dos manipuladores de alimentos, à forma como são manipulados, servidos ou conservados e à higiene das cozinhas e instalações onde são confecionadas e conservadas.

Em 2014, a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE, 2015), na sequência de uma toxifenção alimentar, ocorrida numa escola, em Mirandela, realizou uma ação de fiscalização da qual resultou uma apreensão de 45 Kg de alimentos avariados que apresentavam alteração organoléptica ao nível da desidratação e acumulação de gelo. Os serviços de alimentação prestados pela escola foram ainda suspensos por motivos de falta de requisitos mínimos de higiene.

A segurança alimentar nas cantinas escolares, bem como em qualquer estabelecimento de restauração, é um imperativo na medida em que a comercialização de refeições contaminadas pode ter um considerável impacto na saúde dos alunos e comunidade escolar enquanto utilizadores da cantina.

Desta forma, todas as cantinas devem assegurar a excelência dos alimentos sob o ponto de vista sanitário, de modo a que as refeições servidas não possam constituir um perigo para a saúde pública.

2. Caracterização da atividade e enquadramento legal

Ao longo dos últimos anos, têm-se verificado várias alterações, tanto económicas como socioculturais, nos hábitos alimentares da população e no tipo de alimentos que os consumidores procuram. Segundo Baptista e Antunes (2005), dentro destes fatores incluem-se:

Crescimento da população em meios urbanos;

- A distância e, consequente, tempo médio de deslocação entre a residência e o local de trabalho ou escola;
- O aumento da percentagem de mulheres no mercado e trabalho;
- O aumento do poder de compra;
- As preocupações dietéticas.

Estas alterações potenciam o crescimento do setor da restauração e, simultaneamente, exigem a evolução das técnicas de preparação, confecção, conservação e transporte, de modo a possibilitar às empresas de restauração e catering a oferta de alimentos que, para além da qualidade e segurança microbiológica, devem apresentar qualidade sensorial, sanitária e nutritiva.

Os estabelecimentos de restauração podem ser públicos ou privados, podem ter uma finalidade social, como, por exemplo, as cantinas escolares e lares, ou comercial, como os restaurantes e as pastelarias.

A evolução dos hábitos alimentares, conjugado com as crescentes exigências dos consumidores e os requisitos legais exigidos para o exercício da atividade, exige cada vez mais atenção por parte das empresas do setor alimentar com as questões relacionadas com a segurança alimentar.

De referir que as crises alimentares da segunda metade dos anos noventa, especialmente a BSE (encefalopatia espongiforme bovina, vulgarmente conhecida como doença da vaca louca, é uma doença neurodegenerativa que afeta o gado doméstico bovino), e as dioxinas, justificam também a atual importância acordada à segurança alimentar, que se tornou o principal tema de debate dos primeiros anos do século XXI.

Muitas vezes os conceitos de Segurança Alimentar e Qualidade, apresentam-se como conceitos similares ou mesmo equivalentes. Qualidade é, no entanto, muito mais do que a inocuidade dos alimentos, a que vulgarmente se chama Segurança Alimentar, não podendo, por outro lado existir sem ela. Sendo a Qualidade o conjunto de atributos de um alimento que o tornam preferido na sua escolha, por parte do consumidor, integra naturalmente a exigência da sua inocuidade, condição à partida de rejeição, caso não se confirme. No entanto esta inocuidade, por si só não garante a opção do consumidor. De facto um alimento seguro ou inócuo, se não tiver bom sabor e não responder às qualidades nutricionais, de embalamento, conservação, ou outras que dele espera o consumidor, dificilmente terá a preferência deste último (FIPA, 2004).

A restauração surge como a etapa final de apresentação do alimento ao consumidor. Assim, o consumidor está muito dependente da confiança nos métodos e nos cuidados que foram utilizados no processamento dos alimentos, imediatamente antes de estes chegarem ao seu prato. Se é imprescindível a exigência de garantias de segurança nos primeiros estágios da cadeia de produção dos alimentos, a restauração torna-se uma etapa crucial do processo já que nesta fase poder-se-ão comprometer todos os bons resultados obtidos antes. Só a eficácia e os cuidados aplicados nesta fase permitem manter e garantir a segurança alimentar.

É neste enquadramento que a presente dissertação integra o projeto "Avalição de refeições servidas em Cantina Universitária".

3. Microbiologia dos alimentos

É sabido que alguns microrganismos úteis são usados no fabrico de numerosos produtos alimentares, sendo indispensáveis à sua obtenção, apresentando assim um efeito benéfico na alimentação humana (bebidas fermentadas, produtos maturados e curados). Contudo, existem outros microrganismos que podem produzir alterações nos alimentos, e outros ainda tornam os géneros alimentícios nefastos para o homem. Os germes infecciosos ou as suas toxinas, transmitidos pelos alimentos, são a causa de inúmeros casos de doenças de origem alimentar, em todo o mundo (Lacasse, 1995)

A vigilância microbiológica dos alimentos prontos a comer corresponde a uma área de grande interesse em Saúde Pública, tendo por objetivo assegurar a inocuidade e a salubridade dos alimentos e atuar na prevenção das doenças de origem alimentar (M. Santos *et al.,* 2005).

3.1 Microrganismos

Entre todos os microrganismos que intervêm na alimentação, as bactérias são o grupo mais importante, não só pelo número como também pela diversidade e frequência de ações. A maioria dos alimentos contêm microrganismos, a não ser que tenham sido perfeitamente esterilizados. Quando colocadas em condições propícias, as bactérias multiplicam-se nos alimentos à custa das substâncias nutritivas contidas no produto. Assim, à medida que ocorre o crescimento microbiano, a composição química do alimento modifica-se, levando igualmente a modificações no aspecto, no cheiro e no gosto, ou seja, ocorre a deterioração do alimento. As principais bactérias envolvidas na alteração de legumes pertencem ao género *Erwinia* ou *Pseudomonas*. No caso de legumes preparados (descascados, cortados, raladas), estes libertam açúcares e ácidos orgânicos propícios ao desenvolvimento das bactérias lácticas (*Leuconostoc, Lactobacillus*), que promovem a fermentação e consequentemente a sua deterioração (Lacasse, 1995).

Os fungos, em especial, as leveduras e os bolores, formam também um grupo imponente de microrganismos. Em semelhança às bactérias, os fungos são ubiquitários e se as condições ambientais o permitirem, podem desenvolver-se, o que leva normalmente à deterioração rápida do produto.

Os bolores são responsáveis por vários tipos de alterações tanto nas frutas como nos legumes. Estes encontram-se presentes à superfície dos tegumentos antes da colheita, mas a alteração geralmente, tem início durante a armazenagem. Dos géneros responsáveis por esta deterioração podem-se destacar *Alternaria, Botrytis, Penicillium, Aspergillus* e *Fusarium.*

As leveduras contribuem também para a deterioração dos alimentos, não constituindo um problema de segurança sanitária, contudo podem ser utilizadas como indicadores de contaminações cruzadas. As principais espécies responsáveis pela deterioração de alimentos são *Saccharomyces spp., Hansenula anómala, Pichia membranaefaciens, Torulopsis colliculosa.*

Este grupo de microrganismos, representa no Mundo, a segunda maior causa, logo após aos insetos, das perdas de produtos alimentares (não confecionados) de origem vegetal. As perdas económicas mundiais devidas a este tipo de deterioração representam milhões de dólares todos os anos.

Do ponto de vista sanitário, os fungos presentes nos alimentos são habitualmente considerados inofensivos, contudo, descobriu-se nos anos 60 que algumas estirpes de bolores podem produzir micotoxinas temíveis, especialmente em cereais, nos produtos deles derivados e nas oleaginosas (Lacasse, 1995).

Existem para além das bactérias e dos fungos outros microrganismos que podem estar presentes nos alimentos. Microrganismos esses que não podem multiplicar-se no alimento nem transformá-lo. Contudo a sua presença nos alimentos pode causar infeções virais (vírus), parasitoses (protozoários e vermes parasitas) ou intoxicações alimentares (algas unicelulares) (Lacasse, 1995).
Para prevenir ou retardar as deteriorações de origem microbiana, devem ser tomadas precauções em todas as etapas de manipulação e de tratamento dos géneros alimentícios bem como ajustar as condições de armazenamento de forma a reduzir a velocidade de proliferação.

3.1.1 Microrganismos indicadores

Os testes de avaliação da carga microbiana são muito importantes para verificar as boas práticas de fabricação. Toda a falha na qualidade das matérias-primas, na manutenção dos equipamentos e dos locais, na higiene do pessoal, na eficácia dos tratamentos térmicos ou nas condições de armazenagem traduz-se inevitavelmente por uma elevação da carga microbiana. Por sua vez, um aumento da carga microbiana afeta a duração da conservação dos alimentos e aumenta os riscos sanitários para os consumidores.

Para avaliar a carga microbiana de um alimento não basta realizar um único teste uma vez que as condições ambientais de cultura favorecem determinados grupos de microrganismos em detrimento de outros. Quer isto dizer que não é possível fazer crescer simultaneamente as floras mesófila, psicrófila e termófila nas mesmas condições (Lacasse, 1995).

Os indicadores mais frequentemente pesquisados nos alimentos são a flora mesófila aérobia, que fornece uma indicação da carga microbiana do alimento, e os coliformes que são indicadores de contaminação fecal (Lacasse, 1995).

A flora mesófila é o principal indicador de da higiene geral porque exige as mesmas condições de crescimento do que a maioria das espécies patogénicas. Uma contagem elevada da flora mesófila remete para uma possível presença significativa de espécies patogénicas no alimento.

A maioria dos microrganismos responsáveis pela toxinfeções alimentares podem estar presentes nas fezes das pessoas ou animais doentes. Os principais indicadores de contaminação fecal são os coliformes (coliformes totais, fecais, *Escherichia coli*.), *Enterobactérias*, enterococos e colifagos (Lacasse, 1995).

A pesquisa de coliformes totais é o teste de detecção fecal mais utilizado, quer em alimento, quem em água potável. A abundância dos coliformes nas fezes, a sua sobrevivência em ambientes similares ao de várias outras bactérias patogénicas intestinais e a facilidade da sua detecção fazem delas indicadores preferenciais. Os coliformes são testemunhas importantes quer ao nível da higiene que envolve a manipulação dos alimentos quer da manutenção da cadeia de frio. Este grupo de microrganismos correspondem a Enterobactérias (bacilos de Gram negativo não esporulados anaeróbios facultativos) que apresentam a particularidade de fermentar a lactose produzindo gases em determinadas condições. Os principais representantes deste grupo pertencem aos géneros *Escherichia, Enterobacter, Klebsiella* e *Citrobacter*.

Os coliformes fecais incluem principalmente *E. coli* bem como algumas estirpes de *Enterobacter* e de *Klebsilla*, e estão melhor relacionados com a contaminação fecal do que os coliformes totais. Uma elevada contagem dos coliformes fecais deixa uma séria suspeita em relação à sua inocuidade. À semelhança dos coliformes, uma elevada contagem destes microrganismos sugere falhas na higiene geral e/ou uma temperatura de armazenagem inadequada.

A *E. coli* está incluída no grupo dos coliformes fecais e é a espécie considerada como melhor índice de contaminação fecal. A sua presença em alimentos poderá ser é um indicador de presença de *Salmonella.* A pesquisa de *E.. coli* tem um significado muito mais importante que os testes anteriormente referidos do ponto de vista sanitário, pois a presença paralela de germes entéricos patogénicos não é uma certeza. É por este motivo que se realiza a pesquisa de coliformes totais como teste preliminar, e caso o teste seja positivo prossegue-se para a pesquisa de coliformes fecais e de *E.. coli.* (Lacasse, 1995).

Outros indicadores da higiene geral são as estirpes de *S. aureus* e os bolores e leveduras.

A contagem de *S. aureus* foi proposta como indicador da salubridade para os alimentos cujo preparo requer muita manipulação (sandes, saladas, cremes). Os manipuladores são a principal fonte de contaminação, em especial, alimentos cozinhados. Uma contagem elevada costuma indicar uma fraca qualidade das medidas de higiene pessoal, especialmente lavagem das mãos e salpicos de espirros/tosse, e/ou permanência do produto em condições de armazenamento inadequadas (permanência prolongada à temperatura ambiente) (Lacasse, 1995).

Para determinado produtos, como alimentos ácidos ou que tenham uma atividade de água baixa, a quantidade de leveduras pode servir como critério de qualidade de higiene.

No que diz respeito a um crescimento significativos de bolores em alimentos como derivados de cerais e grãos de oleaginosas, remete para a presença de micotoxinas.

3.2 Fatores determinantes ao desenvolvimento de microrganismos

Como qualquer ser vivo, os microrganismos necessitam de determinadas condições para crescerem e desenvolverem.

É importante conhecer os fatores que favorecem ou inibem a multiplicação microbiana para que, na área da higiene e segurança alimentar, se possam prevenir situações capazes de colocar em risco a saúde do consumidor.

Na contaminação alimentar a relação microrganismos/alimento assume elevada importância. Nesta relação devem ser tidas em linha de conta vários fatores que podem estar ligados diretamente ao produto alimentar, fatores intrínsecos, e os fatores que dizem respeito ao ambiente que envolve os produtos alimentares, fatores extrínsecos.

Os fatores extrínsecos são a temperatura, a atmosfera e a humidade relativa do ambiente.

Os fatores intrínsecos incluem a atividade de água (a_w), o pH, a disponibilidade de nutrientes, o potencial de oxidação-redução e as estruturas e constituintes antibicrobianos.

Estes fatores exercem uma seleção inicial sobre a flora contaminante, favorecendo determinadas espécies em relação às outras. As espécies favorecidas crescem mais rapidamente, o que garante a dominância e por sua vez as suas atividades metabólicas modificam progressivamente o meio e irão formar a flora de alteração (Lacasse, 1995).

3.2.1 Fatores extrínsecos

Os fatores extrínsecos estão ligados às condições ambientais nas quais são mantidos os alimentos durante o seu armazenamento. Estes fatores assumem grande importância, na medida em que podem ser facilmente modificados de maneira a prolongar a vida útil do alimento.

3.2.1.1 Temperatura

A temperatura de armazenamento é o fator ambiental mais importante que afeta a duração de conservação e o tipo de alterações microbianas dos produtos alimentares. Os microrganismos podem pertencer a grupos diferentes, em função das suas preferências térmicas, dado que para se manterem e poderem multiplicar, cada espécie microbiana necessita de uma temperatura adequada, existindo temperaturas ótimas que, quando aliadas aos outros fatores determinantes, propiciam a que multiplicação seja mais rápida.

Os microrganismos podem assim ser divididos em três grupos conforme as suas preferências térmicas: psicrófilos, mesófilos e termófilos.

Os microrganismos psicrófilos têm a particularidade de se desenvolverem à temperatura de refrigeração. Encontram-se em menor número na flora de contaminação, contudo tornam-se rapidamente dominantes após permanência dos alimentos em ambiente refrigerado. Neste grupo encontram-se os bacilos de Gram negativo aeróbios do género *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Micricoccus*, e também determinadas leveduras e bolores (*Aspergillus*, *Cladosporium*) (Lacasse, 1995).

Os microrganismos mesófilos podem crescer entre 20°C e 45°C, sendo a temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 37°C.

Este grupo de microrganismos formam a flora dominante dos alimentos mantidos à temperatura ambiente ou dos alimentos refrigerados que foram submetidos a uma interrupção na cadeia de frio. Neste grupo encontramos um grande número de microrganismos de alteração (como as bactérias lácticas, as enterobactérias coliformes, os estafilococos, a maioria das leveduras e muito bolores). As alterações que ocorrem à temperatura ambiente são muito mais rápidas do que aquelas que têm lugar em ambiente refrigerado. Sendo que este grupo inclui a maioria dos microrganismos patogénicos susceptíveis de originar doenças de origem alimentar, a permanência dos alimentos perecíveis a estas temperaturas pode ter consequências sanitárias temíveis.

Os termófilos, essencialmente bactérias, caracterizam-se por uma temperatura ótima de crescimento entre os 50°C e os 55°C. Exemplos de microrganismos termófilos são bactérias de Gram positivo esporuladas dos géneros *Bacillus* e *Clostridium* (Lacasse, 1995; Baptista e Linhares, 2005).

A temperatura de maior risco para a manutenção de alimentos encontra-se entre os 4°C e os 63°C ("zona de perigo"), sendo a temperatura ótima de crescimento para a maioria dos patogénicos à volta dos 37°C. Abaixo dos 4°C, as bactérias apesar de não morrerem, multiplicam-se mais lentamente, reduzindo a sua atividade metabólica. Quando a temperatura aumenta, as bactérias voltam a encontrar condições adequadas para a sua multiplicação. Acima dos 63°C as bactérias começam a morrer, sendo maior a sua mortalidade à medida que aumenta o tempo de exposição a altas temperaturas. O binómio tempo/temperatura utilizado durante o processamento de alimento deve ser de tal ordem que iniba a multiplicação de microrganismos patogénicos eventualmente presentes. O controlo efetivo destes dois parâmetros é assim um dos principais aspectos a considerar nas medidas preconizadas pela segurança alimentar.

A resistência a elevadas temperaturas, superiores a 100°C depende das características dos microrganismos. Algumas bactérias assumem uma forma mais resistente, esporo, que sobrevive a elevadas temperaturas.

Relativamente aos fungos, a gama de temperaturas ótimas para o seu desenvolvimento varia entre os 25°C e 30°C, para e temperatura mínima, e os 40°C e 45°C, para temperatura máxima. Contudo, alguns fungos são capazes de se desenvolver a temperaturas de refrigeração acima de 0°C (*Penicillium roqueforti*), enquanto outros resistem e desenvolvem-se a temperaturas de 55°C (*Aspergillus fumigatus*) (Baptista e Linhares, 2005).

3.2.1.2 Humidade relativa

A humidade relativa é essencialmente uma medida da atividade de água na fase gasosa e é característica da atmosfera envolvente.

Quando a humidade relativa é muito baixa, os produtos alimentares ficam mais secos, uma vez que a superfície externa perde água, ocorrendo a inibição do crescimento microbiano. Por outro lado, quando esta se apresenta elevada, ocorre condensação e depósito de água, favorecendo assim o crescimento de microrganismos (Pinto e Neves, 2010).

No caso das frutas e legumes recomenda-se manter um grau de humidade relativamente elevado para evitar o deterioração e amolecimento, contudo a humidade não deve ser excessiva para não favorecer o crescimento microbiano (Lacasse, 1995).

3.2.1.3 Composição da atmosfera

A presença ou ausência de oxigénio livre são determinantes no crescimento microbiano. O comportamento dos microrganismos face ao oxigénio é variável, podendo estes ser classificados como aeróbios estritos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos.

Os microrganismos que necessitam de oxigénio para se desenvolver denominam-se aeróbios estritos e crescem facilmente na superfície dos alimentos. Por sua vez, os microrganismos que não são capazes de se desenvolver na presença de pequenas quantidades de oxigénio, denominam-se de microrganismos anaeróbios estritos e multiplicam-se facilmente no interior dos alimentos. A manipulação da atmosfera serve para controlar o desenvolvimento de microrganismos nos alimentos.

3.2.2 Fatores intrínsecos

As características físico-químicas de um alimento, fatores intrínsecos, têm uma função preponderante sobre a composição da flora de alteração. Um produto alimentar constitui para um microrganismo um meio mais ou menos propicio ao seu desenvolvimento. Os microrganismos têm exigências tanto do ponto de vista físico-químico como nutricional. Desta forma, quanto mais as características de um alimento se afastam das exigências óptimas de desenvolvimento do microrganismo, mas retardado é o seu crescimento (Lacasse, 1995).

3.2.2.1 pH

O pH é uma medida que indica o grau de acidez ou alcalinidade. Nos alimentos pode ser inerente ou resultado de processos de fermentação. Deste modo, os alimentos podem ser ácidos ($1<pH<6$), neutros ($pH=7$) ou básico/alcalinos ($8<pH<14$).

Apesar de existirem exceções, podemos ter como exemplos, alimentos muito ácidos alguns frutos, derivados do leite e saladas, e como alimentos pouco ácidos, alguns vegetais, carne peixe e leite.

O comportamento microbiano varia consoante o pH, uma vez que cada tipo de microrganismo possui um pH ótimo de crescimento como é possível observar na tabela 1.

Tabela 1 - Alguns tipos de microrganismos e respectivos pH ótimos de crescimento (Pinto e Neves, 2010).

Microrganismo	pH ótimo
Bactérias	6,0-8,0
Leveduras	4,5-6,0
Bolores	3,5-4,0

3.2.2.2 Atividade da água (a_W)

Os microrganismos precisam de água numa forma disponível para crescerem nos alimentos. A disponibilidade de água para os microrganismos se desenvolverem é indicada pela actividade de água,

que é expressa pelo quociente entre a pressão de vapor de água da solução (P) e a pressão de vapor da água pura (P0), isto é, P/P0. A atividade de água varia entre 0 e 1, sendo que cada alimento apresenta uma a_w característica como é possível observar na tabela 2 (Pinto e Neves, 2010).

Tabela 2 - Tipos de microrganismos e respetivas atividades de água mínimas para crescimento (Pinto e Neves, 2010).

Alimento	aw
Frutos, vegetais, carne e peixe	>0,98
Pão e carne cozida	0,95-0,98
Carne curada e queijos	0,91-0,95
Chouriço	0,87-0,91
Arroz, feijão e ervilhas	0,80-0,87
Marmelada	0,75-0,80
Frutos secos	0,60-0,65
Especiarias e leite em pó	0,20-0,60

A maioria das bactérias patogénicas encontra-se controlada quando a a_w é inferior a 0,85. A produção de toxinas é, na maioria dos casos, inibida a valores de a_w inferiores a 0,90.

O *S. aureus* é uma excepção, podendo crescer e produzir toxina em alimentos com a_w inferiores a 0,90.

No que diz respeito ao desenvolvimento de fungos, ao contrário das bactérias que necessitam de valores de a_w elevados, a actividade de água necessária para o desenvolvimento de bolores e leveduras e para a produção de toxinas é bastante menor. A maior parte destes microrganismos desenvolvem-se em alimentos com valores de a_w superiores a 0,70. Para valores de a_w inferiores a 0,60, os fungos não são capazes de germinar e desenvolver.

A atividade da água é um fator que pode ser manipulado, nomeadamente através da adição de solutos tal como o sal e o açúcar, da remoção de água por processos de secagem ou cozedura e através da congelação que promove a indisponibilidade de água (Baptista e Linhares, 2005).

3.2.2.3 Disponibilidade de nutrientes

À semelhança de qualquer organismo, os microrganismos necessitam de um conjunto básico de nutrientes para o seu crescimento e para que possam realizar as suas funções metabólicas. Entre os nutrientes que as generalidades dos microrganismos necessitam encontram-se a água, hidratos de carbono (fonte de energia), compostos orgânicos e CO_2 (fonte de carbono), aminoácidos (fonte de azoto), sais minerais e vitaminas.

Contudo, os microrganismos apresentam diferentes exigências quanto à necessidade de nutrientes. Existem bactérias pouco exigentes tais como as do solo e as da água que necessitam apenas de sais minerais, azoto e oxigénio. As bactérias mais exigentes encontram-se por sua vez, preferencialmente, nos alimentos de origem animal (carnes, pescado, ovos e produtos lácteos), devido à abundância de nutrientes (glicídios, proteínas, gorduras, vitaminas) (Neves e Pinto, 2010). No que se refere aos fungos, estes são pouco exigentes em matéria de nutrientes para o seu desenvolvimento.

3.2.2.4 Estruturas e constituintes antimicrobianos

Vários alimentos, de origem animal e vegetal, possuem uma estrutura física ou estrutura biológica que os protege dos microrganismos. Como exemplos de tais barreiras é possível enumerar a casca de frutos e vegetais, a casca das nozes, as escamas do pescado, a pele dos animais, conchas de mariscos e as cascas dos ovos (Baptista e Linhares, 2005).
Alguns alimentos possuem na sua constituição antimicrobianos naturais, como é o exemplo da lisozima e ovotransferrina no ovo e da lactoferrina e lactoperoxidase no leite (Pinto e Neves, 2010).

4. Contaminação dos alimentos

Durante toda a cadeia alimentar, do produtor ao consumidor, podem surgir diversos contaminantes que afetam os alimentos e por consequente a saúde humana. Surge assim uma elevada preocupação, por parte de toda a cadeia, em garantir que os alimentos não apresentam qualquer perigo para o consumidor.
Segundo o *Codex Alimentarius*, define-se perigo como "qualquer propriedade biológica, física ou química, que possa tornar um alimento prejudicial para o consumo humano". A Internacional Commission Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) detalhou um pouco mais este conceito definindo perigo como "qualquer contaminação ou crescimento inaceitável, sobrevivência de bactérias em alimentos que possam afetar a sua inocuidade ou qualidade (deterioração), a produção ou persistência de substâncias como toxinas, enzimas ou produtos resultantes de metabolismo microbiano em alimentos".

Os perigos podem então ser classificados, segundo a sua natureza, em três categorias, biológicos, físicos e químicos.

4.1 Contaminação biológica

Das possíveis contaminações, a contaminação biológica é a que representa maior risco à inocuidade dos alimentos. Nesta categoria incluem-se as bactérias, fungos, vírus, parasitas e toxinas.

Os microrganismos podem multiplicar-se nos alimentos e produzir substâncias associadas a doenças de origem alimentar (toxinas).

A manipulação incorreta dos alimentos por parte dos manipuladores pode contribuir para contaminações cruzadas. A contaminação cruzada consiste na transferência de substâncias ou microrganismos prejudiciais à saúde humana de uma fonte contaminada para um alimento não contaminado.

Uma higiene insuficiente durante todas as etapas do processo, em especial a preparação dos alimentos, aumenta a carga microbiana e a diversidade das espécies presentes nos alimentos, assim como a probabilidade de neles se encontrarem estirpes patogénicas.

A permanência dos alimentos em condições propícias ao desenvolvimento de microrganismos promove uma proliferação rápida dos microrganismos e, consequentemente atinge-se o patamar de intolerância para o organismo humano. Além disso, um tratamento térmico insuficiente permite a sobrevivência de um determinado número de microrganismos patogénicos nos alimentos, poderiam ser destruídos durante um eficaz tratamento térmico.

Estima-se que cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos sejam provocadas por microrganismos. Estes podem-se encontrar em quase todos os alimentos, mas a sua transmissão resulta, na maioria dos casos, da utilização de metodologias erradas nas últimas etapas da sua confecção ou distribuição. Embora se conheçam mais de 250 tipos diferentes de bactérias, vírus e parasitas causadores de Doenças de Origem Alimentar, apenas alguns aparecem frequentemente.

De acordo com a National *Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods*, estes microrganismos podem-se classificar segundo o seu perigo e difusão (ASAE, 2015).

A tabela 3 representa a classificação dos microrganismos consoante o seu perigo e difusão.

Tabela 3 - Classificação dos microrganismos consoante o seu perigo e difusão.

Risco severo	**Risco Moderado/ Alta difusão**	**Risco moderado/ Difusão limitada**
Clostridium botulinum tipos A, B, E, F	*Listeria monocytogenes*	*Bacillus cereus*
Shigella disenteriae	*Salmonella spp.*	*Campylobacter jejuni*
Salmonella typhi Salmonella paratyphi A , B	*Shigella spp .*	*Clostridium perfrigens*
Virus das hepatites A e E	*Escherichia coli enteropatogénica (EEC)*	*Staphylococcus aureus*
Brucella abortus	*Streptococcus pyogenes*	*Vibrio Cholerae non-01*
Brucella suis	*Rotavirus*	*Vibrio parahaemolyticus*
Vibrio cholerae 01	*Virus Norwalk*	*Yersinia enterocolitica*
Vibrio vulnificus	*Entamoebea histolytica*	*Giardia lamblia*
Taenia solium	*Diphyllobothrium latum*	*Taenia saginata*
Trichinella spiralis	*Ascaris lumbricoides*	*Trichinella spiralis*
	Cryptosporidium parvum	*Diphyllobothrium latum*

4.1.1 Bactérias

Em condições ideais, nutrientes, temperatura, pH, humidade e concentração de oxigénio favoráveis, em apenas 20 minutos são suficientes para que o número de bactérias duplique, o que significa que um número inicial de 10 bactérias num determinado alimento em condições favoráveis, se multiplicará de tal modo que se terão 640 bactérias ao fim de 2 horas (ASAE, 2015).

A maioria das bactérias morre durante a confecção, mas algumas existem sob uma forma resistente denominada esporo. Trata-se de uma espécie de invólucro que protege a bactéria das condições adversas, permitindo-lhes sobreviver até que se criem as condições que favoreçam a sua multiplicação. O esporo apresenta resistência ao calor, bem como às radiações, antibióticos e agentes desinfetantes. As bactérias esporuladas mais vulgarmente presentes nos alimentos pertencem aos géneros *Bacillus* e *Clostridium* (Baptista e Linhares, 2005).

Na tabela 4 estão representados as principais bactérias implicadas em doenças de origem alimentar e os alimentos mais frequentemente associados.

Tabela 4 - Bactérias implicada em doenças de origem alimentar (ASAE, 2015).

Bactérias Implicadas em Doenças de Origem Alimentar		
Género	**Espécie/Estirpes**	**Alimentos mais frequentemente associados**
Bacillus	*B. cereus*	Arroz, cereais, carne, vegetais, alimentos com contacto com o solo ou pó
Brucella		Leite cru derivado de animais infetados
Campylobacter	*C. jejuni*	Alimentos proteicos crus ou pouco cozinhados, Laticínios
Clostridium	*C. botulinum*	Carnes insuficientemente curadas ou sem conservantes, conservas caseiras de carnes ou vegetais
	C. perfringens	Manipulação inadequada, refrigeração lenta, alimentos aquecidos a baixa temperatura
Escherichia	*E. coli*	Água ou alimentos com contaminação fecal
Listeria	*L. monocytogenes*	Leite e derivados, saladas
Salmonella	*S. enteritidis* *S. typhimurium*	Frango, pato, peru, ovos
	S. typhi *S. paratyphi*	Água
Shigella	*S. dysenteriae*	Saladas, leite, aves, produtos hortícolas
Staphylococcus	*S. aureus*	Carne, leite, ovos, derivados, alimentos ricos em proteína, água; resulta de má manipulação
Vibrio	*V. cholerae* *V. parahaemolyticus*	Água, vegetais, peixe, mariscos e moluscos crus ou insuficientemente cozinhados
Yersinia	*Y. enterocolitica*	Leite cru, aves, carnes, vegetais

De forma a conseguir controlar os perigos, devem conhecer-se as características das bactérias associadas aos alimentos. Na tabela 5 são referidas as temperaturas mínimas e máximas que algumas bactérias suportam.

Tabela 5 - Temperaturas mínimas e máximas de desenvolvimento de algumas bactérias (Baptista et al., 2003).

Bactérias	Tmínima (°C)	Tmáxima (°C)
Bacillus cereus	4	55
Campylobacter jejuni	30	45
Clostridium tipo A e B proteolitico	10	48
Clostridium tipo E não proteolitico	3,3	45
Clostridium perfringens	10	50
Escherichia coli	6,5	49,4
Listeria monocytogenes	-0,4	45
Salmonella spp.	5,2	46,2
Shigella spp.	6,1	47,1
Staphylococcus aureus	7	50
Staphylococcus aureus (toxina)	10	48
Vibrio parahaemolyticus	5	45,3
Vibrio cholerae	10	43
Vibrio vulnificus	8	43
Yersinia enterocolitica	-1,3	42

Staphylococcus aureus

Os estafilococos são cocos de Gram positivo, anaeróbicos facultativos, mas que crescem melhor em meio aeróbico. São microrganismos mesófilos com temperatura ótima entre 35°C e 37°C. A bactéria é facilmente destruída pelo calor. A espécie *S. aureus* é ubiquitário, contudo este patogénico é, habitualmente encontrado nas vias respiratórias (nariz, boca e garganta), na pele (sobretudo em pessoas que apresentam lesões cutâneas infetadas) e nas unhas. Assim a transmissão deste patogénico para os alimentos pode ser facilitada se o manipulador de alimentos não cumprir com as boas práticas de higiene e comportamento pessoal (Lacasse, 1995; Araújo, 1997).

A estirpe *S. aureus* produz enterotoxinas termoresistentes responsáveis pela intoxicação alimentar, denominada intoxicação estafilocócica. Uma dose de toxina inferior a 1,0 ng em alimentos contaminados produzirá sintomas de intoxicação (Forsythe, 2010). Segundo, Furtado, R. (2014), a intoxicação alimentar estafilocócica destaca-se como uma das mais comuns a nível mundial. O período de incubação é de 2 a 4 horas e os sintomas são náuseas, vómitos, dores abdominais, dores de cabeça, cãibras e, alterações temporárias da pressão arterial e da pulsação nos casos mais graves (Pinto e Neves, 2010).

Como forma de prevenir a intoxicação alimentar deve-se evitar a contaminação cruzada; cumprir as regras de higiene pessoal e manipulação de alimentos, bem como do estado de saúde; aplicar tratamentos térmicos suficientes para destruir a toxina (100°C durante 30 minutos) (Pinto e Neves, 2010).

Clostridium sp.

Clostridium sp. é um bacilo de Gram positivo, esporulado, mesófilo e anaeróbio estrito que faz parte da microflora do solo e dos sedimentos aquáticos (Lacasse, 1995; Forsythe, 2010).

O botulismo é a intoxicação alimentar mais conhecida e mais temida, que resulta da ingestão de alimentos que contêm uma neurotoxina produzida por *Clostridium botulinum*, que afeta o sistema nervoso. A intoxicação provocada por esta bactéria pode ser mortal, uma vez que a toxina afeta o sistema nervoso, mesmo quando ingerida em pequenas quantidades (Pinto e Neves, 2010). O período de incubação é de 18 a 36 horas e os sintomas são fadiga extrema, fraqueza, tonturas, visão dupla, dificuldades em falar e engolir, boca seca, perda de consciência, paragem respiratória e cardíaca (Baptista e Linhares, 2005).

Tendo em linha de conta o perigo que esta bactéria apresenta para a saúde pública, é de todo importante conhecer medidas que previnam a sua presença nos alimentos. As medidas passam por ter em atenção à integridade dos enlatados, rejeitando todas as latas opadas, que vertam ou que apresentem qualquer outro defeito que possam colocar em causa o seu estado de conserva; controlar a temperatura de forma a prevenir o crescimento microbiano, sendo que a pasteurização é suficiente para destruir as células vegetativas, contudo não destrói os seus esporos (para que ocorra a destruição dos seus esporos, é necessário sujeitar os alimentos a um aquecimento a 121°C durante 3 minutos); fumagem correta dos alimentos (82°C durante 30 minutos) (Baptista e Linhares, 2005).

Clostridium perfrigens é dos microrganismos mais amplamente distribuídos na natureza, sendo que a sua capacidade de esporular contribui para esta ampla distribuição (Araújo, 1997). Este microrganismo é classificado entre os agentes de infeções alimentares, contudo, apenas uma enterotoxina é responsável pela sintomatologia. Esta toxina é ativa no intestino após a ingestão de um grande número de células vivas, o que faz com que este seja considerado mais como agente infecioso do que como agente de intoxicação (Lacasse, 1995). A intoxicação por *C. perfringens* ocorre na maioria das situações quando não é controlada a temperatura após a cozedura dos alimentos. São exemplos os casos em que estão envolvidas grandes quantidades de alimentos preparados com antecedência e arrefecidos lentamente e/ou inadequadamente refrigerados. O período de incubação é de 24 horas e os sintomas da intoxicação incluem geralmente diarreia e dores abdominais, surgindo por vezes, náuseas, anorexia a cefaleias ligeiras (Pinto e Neves, 2010; Araújo, 1997).

Este microrganismo é responsável por uma parte de intoxicações alimentares na restauração coletiva, deste modo, deverão ser tomadas medidas preventivas para que se previna o seu aparecimento e/ou desenvolvimento, tais como cumprir as boas práticas de manipulação e higiene; sujeitar o alimento a temperaturas que consigam eliminar a bactéria, 60°C (esta temperatura não destrói esporo); manter os alimentos, que não sejam consumidos de imediato, a temperaturas superiores a 65°C ou arrefecidos a temperaturas inferiores a 10°C num período de 2 a 3 horas; Antes de servidos, os pratos devem ser aquecidos novamente a pelo menos 75°C para garantir a destruição de formas vegetativas eventualmente presentes (Pinto e Neves, 2010).

Bacillus cereus

B. cereus é um bacilo de Gram positivo, esporulado, aeróbio e produtor de exotoxinas. A sua temperatura ótima de crescimento varia entre os 30°C e os 40°C. É uma bactéria amplamente disseminada pela natureza. O esporo é resistente à confecção habitual dos alimentos e à pasteurização, o que permite a sua multiplicação mesmo em alimentos cozinhados e pasteurizados, que são mantidos posteriormente à temperatura ambiente.

As duas formas clínicas da doença estão associadas a exotoxinas diferentes. A toxina emética é um peptídeo produzido por determinadas estirpes de *B. cereus* durante o seu crescimento no alimento, e é resistente ao calor (resiste a uma incubação a 126°C durante 90 min). Os sintomas desta intoxicação são náuseas e vómitos e podem surgir rapidamente, entre 15 minutos a 5 horas após a ingestão (Lacasse, 1995; Linhares e Antunes, ASAE, 2015).

Relativamente à toxina diarreica, enterotoxina, é uma proteína que atua sobre a mucosa intestinal, o que provoca diarreias aquosas e dores abdominais. O período de incubação é de 10 a 22 horas após a ingestão do alimento. Ao contrário a toxina anteriormente referida, a toxina diarreica é facilmente destruída por aquecimento (5 minutos a 60°C são suficientes) (Baptista e Antunes, 2005; Lacasse, 1995).

Como medidas preventivas sugere-se uma correta confecção dos alimentos de forma a eliminar a formas vegetativas; manter os alimentos preparados a temperaturas superiores a 65°C de forma a evitar o desenvolvimento de formas vegetativas; arrefecimento rápido dos alimentos preparados que vão ser refrigerados, no sentido de prevenir a germinação dos esporos (Pinto e Neves, 2010).

Salmonella sp.

A *Salmonella* faz parte da família das Enterobactérias. São bacilos de Gram negativo, anaeróbias facultativas, mesófilos e não esporuladas. Esta bactéria tem uma temperatura ótima de crescimento de 37°C. *Salmonella* desenvolve-se em condições de elevado teor de água, contudo, não se multiplica a temperaturas de refrigeração. A pasteurização é um processo térmico utilizado para eliminar esta

bactéria. O seu principal reservatório é o intestino dos animais e dos seres humanos infetados, sendo desta forma disseminadas com as matérias fecais no ambiente, onde persistem muito tempo. Os principais veículos da *Salmonella* são os produtos alimentares de origem animal, nomeadamente, carne de bovino e aves, assim como águas contaminadas por matérias fecais.

As salmonellas são bactérias que invadem o intestino e cuja ação patogénica está associada à sua capacidade de penetrar na mucosa intestinal e nela se multiplicar (Pinto e Neves, 2010; Lacasse, 1995).

As doenças causadas por *Salmonella* podem ser subdivididas em três grupos, a febre tifóide, doença que tem como agente etiológico a *Salmonella typhi*; a febre entérica que é causada por *Salmonella paratyphi*, e as enterocolites ou salmoneloses, que são ocasionadas pelos restantes serotipos de *Salmonella* (Cardoso e Carvalho, 2006).

A infeção verifica-se após a ingestão de um grande número de bactérias vivas. Os primeiros sintomas aparecem subitamente 12 a 48 horas seguidas da ingestão da refeição contaminada. Manifestam-se sobretudo por diarreia e dores abdominais, acompanhadas na maioria dos casos por febre (Lacasse, 1995).

Uma vez que esta bactéria é causadora de infeções graves, deve-se ter alguns cuidados básicos para evitar a sua presença nos alimentos entre os quais controlar a nível da produção primária, a alimentação animal (*Salmonella sp*. nas rações pode colonizar os animais); evitar a contaminação cruzada; evitar deixar os alimentos propícios ao crescimento de *Salmonella* a temperaturas críticas e respeitar rigorosamente as regras de higiene (ASAE, 2015).

Shigella sp.

Segundo a OMS, *Shigella* é um género de bactéria considerada, a nível mundial, como uma das principais causas de diarreia e disenteria (diarreia com sangue e muco nas fezes).
Shigella é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, anaeróbia facultativa, de gram negativo e que apresenta morfologia de um bacilo. A sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C. *Shigella* está pouco distribuída pelo ambiente, não havendo conhecimento de reservatórios animais, à excepção do homem. É eliminada pelas fezes do indivíduo portador ou do indivíduo infectado durante o período de convalescença. A contaminação pode acontecer através das fezes, directamente através das mãos ou, com maior frequência, indirectamente através dos alimentos ou água contaminada por matérias fecais ou tendo os insectos como vectores intermédios. Uma vez no organismo, *Shigella* pode invadir e destruir as células de revestimento do intestino grosso, provocando ulceração da mucosa e diarreia sanguinolenta. Os sintomas incluem ainda febre e dores abdominais (Araújo, 1997). Os sintomas surgem entre 1 a 4 dias após a ingestão de alimentos

contaminados. A dose infeciosa é baixa, estima-se que menos de 100 microrganismos são suficientes para provocar a infeção.

Shigella apresenta uma temperatura ótima de crescimento de 37°C, sendo destruída pelo calor (a pasteurização é suficiente para destruir a bactéria). As infeções provocadas por *Shigella dysenteria* são as mais severas.

A higiene pessoal, em particular a lavagem das mãos de forma correta, é a principal estratégia de prevenção (ASAE, 2015).

Campylobacter jejuni

Campylobacter sp. é um pequeno bacilo de Gram negativo pertencente à C*ampylobacteriaceae. C. jejuni* tem uma temperatura óptima de crescimento entre 42°C e 43°C. O seu habitat normal é o intestino dos animais, especialmente de aves, bovinos e suínos. A contaminação fecal da água e dos alimentos pode originar a infeção alimentar denominada de campilobacteriose (ASAE, 2015).
Campylobacter sp. é a principal bactéria responsável por diarreias de origem bacteriana na União Europeia. Os principais sintomas são dores abdominais que acompanham uma diarreia profusa (até 20 evacuações por dia), e aparecem habitualmente dois a cinco dias após o consumo de água ou de alimentos contaminados (Lacasse, 1995).
A prevenção desta infeção alimentar passa por cozinhar convenientemente as carnes, evitar contaminação cruzada, evitar o consumo de carnes mal cozinhadas, aves em particular, de leite não pasteurizado e de água não tratada.

Yersinia enterocolitica

Yersinio enterocolitica é um bacilo de gram negativo que pertence à família Enterobacteriaceae. Esta bactéria tem uma temperatura ótima entre os 25°C e 37°C. Os tratamentos térmicos normalmente utilizados na confecção de alimentos são suficientes para destruir a bactéria.
Yersinia enterocolitica é um microrganismo de distribuição ubiquitária, sendo isolado em animais, alimentos e água. Os porcos são o seu principal reservatório. Os veículos de transmissão da maioria das infeções têm sido os alimentos e água. Dependendo da estirpe, *Yersinia enterocolitica*, pode causar vários tipos de sintomas. Os mais comuns são diarreia e dores abdominais fortes podendo estar associados a febre, inflamação da garganta, fezes sanguinolentas, erupção cutânea, náuseas, cefaleias, fraqueza generalizada, dores nas articulações e vómitos. Estes sintomas surgem 1 a 11 dias após o consumo do alimento contaminado (ASAE, 2015).

Uma vez que a refrigeração não previne o crescimento deste patogénico em alimentos, os tratamentos térmicos (principalmente em carne de porco) são uma das medidas tomadas para minimizar a contaminação (Pinto e Neves, 2010).

Listeria monocytogenes

L. monocytogenes é uma das seis espécies do género *Listeria*. É um bacilo de Gram-positivo, anaeróbio facultativo e não esporulado. Apresenta uma temperatura ótima de crescimento entre os 30°C e os 37°C. A pasteurização convencional elimina esta bactéria do leite.

Presente no solo, água, esgotos e vegetação morta, pode ser igualmente encontrada na flora intestinal de animais, aves domesticas e humanos. Os principais alimentos associados são leite crú, leite pasteurizado, queijos.

Nos adultos e nos recém-nascidos, as manifestações clínicas de listeriose descritas com maior frequência são septicémia e/ou infecções meníngeas. Nas grávidas, a infecção ocorre geralmente no terceiro trimestre de gestação. O início das doenças referidas é normalmente precedido por sintomas de gripe e febres persistentes e sintomas gastrintestinais como náuseas, vómitos e diarreia.

Estas infecções resultam frequentemente em aborto ou parto prematuro. As medidas preventivas prendem-se com o controlo das boas práticas de higiene, evitar contaminações cruzadas, cozinhar bem as carnes, peixe e vegetais e consumir apenas leite pasteurizado (ASAE, 2015; Pinto e Neves, 2010; Jay *et al.*, 2005).

Escherichia coli

E. coli é um bacilo de Gram negativo, anaeróbio facultativo da família das Enterobactérias. A sua temperatura ótima de crescimento é 37°C. *E. coli* é uma bactéria da flora intestinal do Homem e dos animais. A maioria das estirpes é inofensiva e a sua pesquisa em água e em alimentos serve simplesmente como indicador da contaminação fecal. Contudo, existem algumas estirpes patogénicas que podem provocar gastroenterites, classificadas como enteropatogénicas. Entre as diferentes síndromas ligadas à *E. coli*, a que atrai a atenção atualmente é a colite hemorrágica provocada pela *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Os sintomas mais comuns são colite hemorrágica caracterizada por uma diarreia sanguinolenta, fortes dores abdominais, vómitos e ausência de febre. Em casos mais graves pode ocorrer síndroma hemolítico urémico e Púrpura Trombótica Trombocitopénica em crianças e idosos, respectivamente. Estas síndromas caracterizam-se por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopénia, alterações da função renal, febre e anomalias do sistema nervoso central. A taxa de mortalidade associada é muito elevada (ASAE, 2015).

Vibrio spp.

O *Vibrio spp. é uma* bactéria de Gram negativo, pertencentes à família *Vibrionaceae. São* anaeróbios facultativos, mesófilos e facilmente destruídos pelo calor. Desenvolve-se a uma temperatura ótima de 37°C (ASAE, 2015).

Existem 35 espécies de *Vibrio* onde 12 delas são consideradas patogénicas para o homem.

Vibrio cholerae que origina uma doença frequentemente mortal, a cólera. A transmissão pode ocorrer através do contacto com indivíduos infetados ou via água contaminada, podendo a contaminação dos alimentos suceder. Esta doença tem origem, principalmente, em países em desenvolvimento onde não existem condições sanitárias.

Vibrio parahaemolyticus é o principal responsável pelas toxinfeções alimentares durantes os meses quentes no Japão. Trata-se de uma bactéria marinha, frequentemente presente nos peixes e frutos do mar antes de serem cozinhados.

A vibriose associada a *Vibrio parahaemolitycus* declara-se geralmente de 12 a 24 horas após a ingestão de um grande número de células vivas com os alimentos contaminados. Os sintomas associados a esta doença são normalmente as diarreias líquidas, as dores abdominais e nalguns casos febre e fezes com sangue.

Vibrio vulnificus é causa de septicémicas que surgem cerca de 16 a 38 horas após a ingestão do alimento contaminado. É uma bactéria isolada em água e em crustáceos. As ostras cruas constituem o principal veículo de transmissão da infecção por V. vulnificus nos Estados Unidos.

Cozinhar corretamente os produtos do mar, principalmente no verão (temperaturas internas de preparação superiores a 70°C são suficientes para destruir a bactéria), manter os mesmo em refrigeração durante o seu armazenamento e evitar a contaminação cruzada são as medidas preventivas que se devem adoptar a fim de evitar a toxinfeções alimentares devido a esta bactéria (Lacasse, 1995).

4.1.2 Parasitas

As Doenças de Origem Alimentar provocadas por parasitas são muito menos frequentes do que as de origem bacteriana. Os parasitas, que são muito maiores do que as bactérias, podem crescer e atingir o estado adulto no tracto gastrointestinal do homem, ou ser diretamente ingeridos por consumo de tecidos de animais contaminados.

As infeções parasitárias estão normalmente associadas a produtos mal cozinhados ou a alimentos prontos a comer que não sofreram qualquer tipo de tratamento térmico (saladas) (Baptista e Linhares, 2005).

Entre os principais parasitas causadores de Doenças Origem Alimentar encontram-se *Giardia lamblia ou intestinalis*, *Cryptosporidium parvum* (protozoários) e *Trichinella spiralis* (verme).

Na tabela 6 estão apresentados os principais géneros de Parasitas e os respectivos alimentos mais frequentemente associados a doenças de origem alimentar de.

Tabela 6 - Parasitas envolvidos em doenças de origem alimentar (ASAE, 2015).

Parasitas envolvidos em doenças de origem alimentar		
Género	**Espécie**	**Alimentos mais frequentemente associados**
Cryptosporidium	*C. parvum*	Leite, água, vegetais Transmissão oral-fecal Também ocorre transmissão indivíduo-indivíduo
Diphyllobothrium		Salmão Outros peixes
Entamoeba	*E. histolytica*	Água e alimentos crus (frutos e vegetais)
Giardia	*G. lamblia (ou intestinalis)*	Alimentos ou águas expostas a contaminação fecal
Ascaris	*A. lumbricóides*	Frutos e vegetais consumidos com casca
Anisakis	*A. simplex*	Salmão, bacalhau, arenque Esta larva encontra-se no músculo de muitos peixes
Taenia	*T. saginata* *T. solium*	Carne infetada, crua ou mal cozinhada
Trichinella	*T. spiralis*	Javali, porco Músculo de animais que comem carne
Cyclospora	*C. cayetanensis*	Água e alimentos contaminados com fezes

4.1.3 Vírus

Alguns vírus são causadores de Doenças de Origem Alimentar. Embora não se multipliquem nos alimentos, uma vez que são específicos para as células humanas, a sua destruição também não ocorre a não ser que os alimentos sejam devidamente cozinhados. A sua especificidade também implica que os vírus que infectam animais, como é o caso do vírus da peste suína, não representem quaisquer perigos para a saúde humana, sendo o seu controlo justificado apenas por uma questão de sanidade animal.

Os vírus mais frequentemente implicados em Doenças de Origem Alimentar são os da hepatite A e da hepatite E, os rotavírus, principal causa de diarreia infantil, e os vírus da família Norwalk, que provocam gastroenterite (ASAE, 2015).

A tabela 7 representa os vírus e respetivos alimentos mais frequentemente associados a doenças de origem alimentar.

Tabela 7 - Vírus implicados em doenças de origem alimentar (ASAE, 2015).

Vírus implicados em doenças de origem alimentar	
Género	**Alimentos mais frequentemente associados**
Astrovírus	
Hepatite A	Água, Marisco, Saladas
Hepatite E	Água
Rotavírus	Frutas, saladas
Vírus de Norwalk (ou noravírus ou calicivírus)	Água

Estima-se que cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos sejam provocadas por microrganismos. Estes podem-se encontrar em quase todos os alimentos, mas a sua transmissão resulta, na maioria dos casos, da utilização de metodologias erradas nas últimas etapas da sua confecção ou distribuição. Embora se conheçam mais de 250 tipos diferentes de bactérias, vírus e parasitas causadores de Doenças de Origem Alimentar, apenas alguns aparecem frequentemente.

4.2 Contaminação química

Existem substâncias químicas indesejáveis que podem, por diversas razões, contaminar o alimento e constituir um perigo para a saúde dos consumidores. Essas substâncias incluem contaminantes de origens industriais (dioxinas, metais pesados), toxinas produzidas por organismos vivos como fungos, algas e algumas plantas e frutos e também os contaminantes resultantes do processamento alimentar, surgindo nos alimentos como subprodutos das diferentes tecnologias.

Os riscos químicos podem também decorrer da adição voluntária de produtos usados nos processos de produção primária ou de transformação, tais como aditivos alimentares, resíduos de pesticidas e medicamentos veterinários e também de produtos que migram dos materiais em contacto com os alimentos (Tabela 8).

Tabela 8 - Perigos químicos, alimentos e doenças associadas (ASAE, 2015).

Perigos Químicos	Exemplos de perigos	Exemplos de alimentos associados	Potenciais doenças
Toxinas naturais	Aflatoxinas	Frutos secos, milho, leite e derivados	Cancro, malformações congénitas, partos prematuros, alterações do sistema imunitário, doenças degenerativas do sistema nervoso, alterações hormonais, disfunção ao nível de diversos orgãos, alterações de fertilidade, doenças osteomusculares, alteração de comportamento.
	Solanina	Batata	
	Toxina marinas	Bivalves, marisco	
Poluentes de origem industrial	Mercúrio, cádmio e chumbo	Peixe	
	Dioxinas, PCBs	Peixe, gordura animal	
Contaminates resultantes do processamento alimentar	Acrilamida	Batatas fritas, café, biscoitos, pão	
	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Fumados, óleos vegetais, grelhados	
Pesticidas	Insecticidas, herbicidas, fungicidas	Legumes, frutas e derivados	
Medicamentos veterinários	Anabolizantes, antibióticos	Carne de aves, porco, vaca	
Aditivos não autorizados	Sudan I-IV, Para red (corantes)	Molhos, especiarias	
Materiais em contacto com alimentos	Alumínio, estanho, plástico	Alimentos enlatados ou embalados em plástico	
Outros	Produtos de limpeza	-	

De forma a minimizar os problemas de saúde pública, resultantes do consumo de alimentos contaminados, a Comissão *Codex Alimentarius*, criada conjuntamente pela FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação) e pela OMS (Organização Mundial de Saúde) desenvolveram normas alimentares, regulamentos e códigos de práticas com o objetivo de proteger o consumidor e assegurar práticas comerciais integras e promover a coordenação de todas as

normas alimentares. Desde o seu início, a Comissão Codex Alimentarius já adoptou mais de 3200 níveis máximos de resíduos para pesticidas e produtos de uso veterinário (ASAE, 2015).

4.3 Contaminação física

A qualquer etapa da sua produção, os alimentos podem ser contaminados com matérias ou objetos estranhos, que poderão constituir um risco para o consumidor.
A tabela 9 representa as principais origens dos perigos físicos.

Tabela 9 - Principais origens dos perigos físicos (Baptista e Linhares, 2003).

Material	Principais origens
Vidro	Garrafas, jarras, lâmpadas, janelas, utensílios, proteção de medidores (ex.: termómetros)
Madeira	Produção primária, paletes, caixas, material de construção, utensílios
Pedras	Campo, material de construção
Metal	Equipamentos, campo, arames, operadores
Isolamento/revestimento	Material de construção
Ossos	Processamento inadequado
Plástico	Embalagens, equipamentos
Objetos de uso pessoal	Operadores/manipuladores

4.4 Fontes de contaminação

Os microrganismos presentes nos alimentos podem ter várias origens, das quais se podem destacar a microflora do solo, da água, do ar, dos próprios alimentos, assim como os microrganismos introduzidos durante as manipulações (Lacasse, 1995).

4.4.1 Água

As águas naturais não tratadas contêm numerosos microrganismos que podem contaminar os alimentos caso estas sejam empregues nos alimentos.

As atividades agrícolas e os esgotos são fontes de contaminação da água por microrganismos entéricos de origem animal e humana. As águas não tratadas contêm frequentemente contaminantes fecais, tais como bactérias coliformes (*E. coli*, *Enterobacter*) e enterococos (*Enterococcus*), mas também outras espécies patogénicas como vírus entéricos e parasitas. Estes contaminantes propagam-se por

via hídrica, de tal forma, que a água é a principal via de disseminação dos microrganismos fecais (Lacasse, 1995).

A qualidade microbiológica da água assume grande importância na contaminação dos produtos alimentares. Desta forma, a água utilizada para o tratamento ou preparo dos alimentos deve respeitar os limites estipulados para a água de consumo humano descritos no Decreto-Lei 236/1998, que estabelece as normas, critérios e objetivos da qualidade da água. Segundo o Decreto-Lei 236/1998, as águas destinadas ao consumo humano não devem conter organismos patogénicos.

4.4.2 Solo

A microflora do solo varia conforme o teor do solo em matéria orgânica e as condições climatéricas. O solo é composto por resíduos de vegetais e animais, incluindo matérias fecais que servem de fertilizantes, que contribuem para a microflora do solo. A frequência da fertilização das terras agrícolas por matérias fecais influencia a contaminação dos alimentos por germes entéricos (coliformes, salmonelas e enterococos).
Os períodos de frio e de seca favorecem as espécies que possuem formas de resistência, tais como, bactérias esporuladas (*Clostridium, Bacillus*), fungos e leveduras (Lacasse, 1995).

A quantidade de solo que adere aos produtos alimentares influencia a sua carga microbiana, dessa forma, os produtos alimentares mais expostos aos microrganismos do solo são principalmente os tubérculos e as raízes (batata, cenoura, nabo, beterraba), mas também, alimentos que crescem rente ao solo. (Lacasse, 1995).

4.4.3 Ar e poeiras

O ar não é um meio propicio ao desenvolvimento de microrganismos dada a ausência de fonte nutritiva e a falta de humidade. Contudo, no ar encontram-se microrganismos provenientes da microflora do solo ou de matérias em decomposição que são levantadas pela agitação do ar. A qualidade microbiológica do ar nas indústrias/setores alimentares é um parâmetro que deve ser controlado, uma vez que os microrganismos presentes no ar acabaram por se depositar sobre os alimentos ou superfícies de trabalho. De forma a reduzir a contaminação dos alimentos por microrganismos veiculados pelo ar recomenda-se cobrir tanto quanto possível os alimentos, proceder a uma correta higienização e evitar a agitação excessiva do ar (Lacasse, 1995). Além disso, caso existam janelas, estas devem permanecer fechadas na zona de laboração para evitar a entrada de poeiras e consequente contaminação (Pinto e Neves, 2010).

4.4.4 Manipuladores de alimentos

De acordo com Baptista e Linhares os veículos responsáveis pela contaminação biológica dos alimentos são sobretudo os manipuladores, os utensílios e as superfícies de trabalho.

O Homem possui flora normal na pele, nas vias respiratórias e digestivas. Os manipuladores de alimentos podem contaminá-los devido a sua flora nasal (*S. aureus*) que advém dos salpicos provenientes de espirros e/ou tosse que podem atingir os alimentos. Além disso, os manipuladores que tiveram uma doença contagiosa, uma gastroenterite ou uma ferida infetada apresentam maior probabilidade de contaminar o alimento (Lacasse, 1995; Baptista e Linhares, 2005).

No que diz respeito aos manipuladores estes podem ser um veículo responsável pela contaminação cruzada, caso ocorra o contacto das mãos com alimentos crus seguido do contacto com alimentos confecionados, ou quando as mãos contactam com diferentes alimentos e não são lavadas quando se muda de tarefa.

Os utensílios (facas, tenazes, tábuas de corte), superfícies de trabalho e outros equipamentos contribuem para a contaminação cruzada no caso em que é utilizada a mesma faca para cortar alimentos crus e cozinhados, sem ter havido uma correta higienização entre as duas utilizações. O mesmo se aplica quando se utiliza a mesma bancada para preparar alimentos crus e cozinhados sem ter havido uma correta higienização entre as duas preparações (Baptista e Linhares, 2005).

5. Doenças de origem alimentar

As doenças transmitidas por alimentos abrangem um amplo espectro de doenças e são um problema crescente de saúde em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que morrem anualmente mais de dois milhões de pessoas por doenças diarreicas (Calhau, M. 2014). Estas doenças são o resultado da ingestão de alimentos contaminados com microrganismos ou produtos químicos.

Segundo Baptista e Antunes (2005), um alimento pode causar doenças por diferentes motivos, nomeadamente por:

- Existirem nele microrganimos patogénicos, que pela sua proliferação, pela sua produção de toxinas ou ambas as situações, podem ocasionar quandro clínicos de doença;
- Terem sido contaminados, acidentalmente, com alguma substância tóxica;
- Terem sido adicionadas substâncias para modificar alguma das suas caracteristicas, e que de seguida tornam-se tóxicas para o ser humano;
- Terem sido inadvertidamente introduzidos objetos estranhos que possam causar lesões ao consumidor.

Para que ocorra uma doença transmitida por alimentos, por via da ação de agentes biológicos, os microrganimos patogénicos ou a sua toxina terão de estar presente no alimento. No entanto, esta não é condição suficiente para que a intoxicação ocorra, é necessário igualmente que:

- O microrganimo patogénico se encontre em quantidade suficiente para causar uma infeção ou para produzir toxinas;
- O alimento permaneça na "zona de perigo" de temperatura por tempo suficiente para que o microrganismo se multiplique e/ou produza toxina;
- O alimento seja capaz de sustentar o crescimento dos microrganismos patogénicos;
- Seja ingerida uma quantidade suficiente do alimento que provoque a doença (dose infetante) do indivíduo.

A dose infetante varia de indivíduo para indivíduo. Pessoas com um sistema imunitário imaturo, crianças, grávidas e idosos, serão afetadas por uma dose infetante menor que a necessária para outras pessoas. Lares, hospitais e escolas onde se podem encontrar estes grupos de risco deve ser prestada uma atenção especial à confeção dos alimentos (Forsythe, 2010).

As doenças transmitidas por alimentos são classificadas em infeções ou intoxicações ou infeções mediadas por toxina, dependendo do modo de atuação do agente causador da doença.

As infeções transmitidas por alimentos é uma doença que resulta da ingestão de alimentos contendo microrganismos vivos prejudiciais, como *Salmonella, Shigella*, *B. cereus*, vírus de hepatite A e *Trichinella spiralis*.

As intoxicações alimentares são causadas por alimentos quando as toxinas estão presentes no alimento ingerido, mesmo que os microrganismos que lhes deram origem tenham sido eliminados. Essas toxinas não possuem odor ou sabor, não sendo detectável organoléticamente a sua presença nos alimentos. Alguns exemplos deste tipo de toxinas são a toxina produzida pelo *Clostridium botulinum*, a enterotoxina do *Staphylococcus* e as micotoxinas.

No caso de infeções mediadas por toxinas, a produção da toxina dá-se após a ingestão do alimento, quando este possui uma determinada quantidade de microrganimos patogénicos, capazes de produzir ou de libertar toxinas quando ingeridos e instalados no intestino. Entre os microrganismos que podem ocasionar este tipo de situações inclui-se *Vibrio cholerae* e *Clostridium perfrigens* (Linhares e Antunes, 2005).

Contudo, outros autores, apenas fazem distinção de dois tipos de toxinfecções alimentares: as infecções alimentares, que se devem à ingestão de um grande número de germes infecciosos vivos e as intoxicações alimentares que resultam da absorção de toxinas microbianas formadas no alimento antes do seu consumo (Lacasse, 1995).

As doenças de origem alimentar não se distinguem facilmente entre si uma vez que os seus sintomas são, na maioria das vezes, muito semelhantes, entre náuseas, vómitos, dores abdominais e diarreia. Para se determinar a causa exata da doença é necessária, muitas vezes, um estudo aprofundado que engloba uma análise química ou microbiológica dos alimentos, o que só acontece quando o número de vítimas é elevado ou quando a gravidade da doença o exigir (Lacasse, 1995).

5.1 Doenças de origem alimentar em Portugal

Segundo a investigação laboratorial de toxifenções alimentares realizada no ano de 2013 pelo Instituto Nacional de Saúde Dr.º Ricardo Jorge, INSA, referente ao período 2009-2013, as refeições mistas e os produtos de pastelaria e bolos são o tipo de género alimentício onde predominantemente é identificado o agente etiológico da toxinfeção alimentar.

Na tabela 10 pode observar-se o número de surtos e de casos humanos investigados pelo INSA, em que foram identificados os agentes etiológicos causadores dos respectivos surtos.

Tabela 10 - Surtos com agente etiológico identificado, 2009-2014 (Viegas, S. *et al*., 2015).

Número	**2009**	**2010**	**2011**	**2012**	**2013**
Surtos	11	4	8	7	10
Casos	251	56	101	135	183
Hospitalizados	90	0	1	1	17
Mortes	1	0	-	0	-

A caracterização molecular das estirpes em laboratório é importante, uma vez que permite identificar o surto, bem como as fontes de contaminação na cadeia alimentar.

Segundo o presente estudo, a bactéria *Staphylococcus* spp é o principal agente etiológico responsável pelas toxinfeções alimentares seguindo da bactéria *Clostridium botulinum* (Correia, C., 2015).

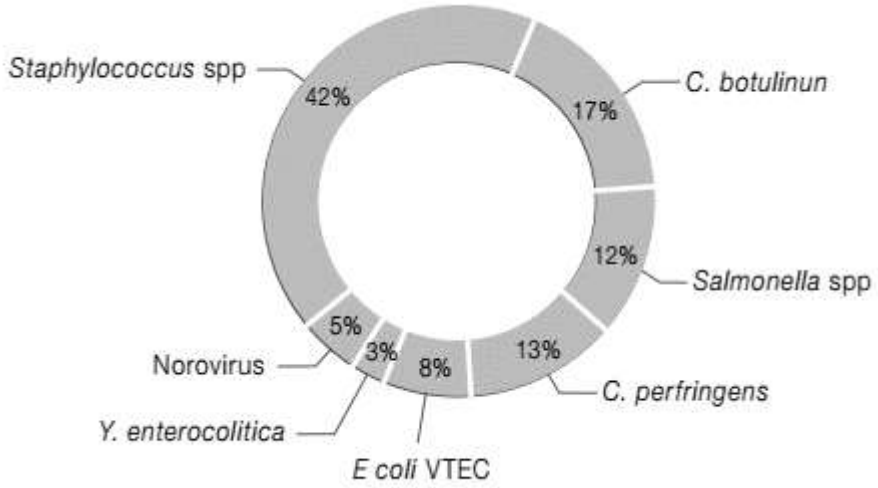

Figura 1 - Agentes causais de toxinfeções alimentares 2009-2013 (Viegas, S, *et al*., 2014).

O mesmo estudo revela ainda que as cantinas e as casas particulares são os locais onde ocorre a exposição do alimento implicado no surto.

Relativamente ao ano de 2014, foram investigados 13 surtos dos quais resultaram 589 casos e 56 hospitalizações. Apenas em 7 surtos foram identificados os agentes causais: 5 surtos de Norovírus, 1 surto por *Salmonella* e 1 surto por toxina botulínica.

As conclusões retiradas dos dois estudos apresentados pelo INSA revelam que a manutenção dos alimentos a uma temperatura inadequada, associada a um período de tempo favorável ao desenvolvimento microbiano, muitas vezes ocorrendo simultaneamente com procedimentos incorretos promotores de contaminações cruzadas, continuam a ser os fatores contributivos mais evidentes na ocorrência de surtos de toxinfeções alimentares (Correia, C., 2015).

5.2 Doenças de origem alimentar na Europa

Segundo a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), em 2013, foram registados, na União Europeia, 214 779 casos confirmados de *Campylobacter sp.* em humanos, mais 463 casos que no ano anterior. *Campylobacter sp.* é o patogénico bacteriano mais relatado como causador de doenças de origem alimentar desde 2005, em relação aos anos anteriores.

O número de casos confirmados de salmonelose em humanos foi de 82 694, sendo a principal fonte de infeção a carne fresca de aves de capoeira e carne de porco. Na realidade a incidência de salmonelose tem vindo a diminuir na União Europeia com tendência significativa, sendo que, em 2012 foram registados 90883 casos, em 2011, 966 082 e em 2010, 101 589 casos. A salmonelose ocupa o segundo lugar enquanto infeção zoonótica.

Relativamente à infeção causada por *E.. coli* verotoxigénica, verificou-se um aumento de 6,3% em relação a 2012, com 6043 casos em 2013.

Nos estado-membros registram-se ainda, no ano de 2013, 6471 casos de *Yersinia* e 1763 *Listeria*, números relativamente idênticos aos anos anteriores (EFSA).

6. Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP)

O HACCP é um sistema de prevenção e controlo da segurança alimentar, aplicado a toda a cadeia alimentar, desde a produção primária ao consumidor final, no qual são identificados os perigos que têm impacto no consumo, estabelece medidas preventivas a adotar para evitar e determina o seu controlo. Permite identificar etapas de processamento susceptíveis que possam levar a uma falha de segurança do produto, através de contaminação física, química ou microbiológica, e também determinar os Pontos Críticos de Controlo (PCC) e mantê-los sob vigilância. (CAC, 2003; Afonso, 2006).

A avaliação e o controlo dos perigos dos alimentos, consiste na aplicação dos seguintes princípios:

- Princípio 1 – Análise de perigos.
- Princípio 2 – Determinação de pontos de controlo crítico (PCC).
- Princípio 3 – Estabelecimento de limites críticos para os PCC.
- Princípio 4 – Estabelecimento de procedimentos de monitorização dos PCC.
- Princípio 5 – Estabelecimento de ações corretivas a tomar caso a monitorização indique que um PCC não está sob controlo.
- Princípio 6 – Estabelecimento de procedimentos de verificação para confirmar que o sistema HACCP está a funcionar corretamente.
- Princípio 7 – Manutenção de registos e documentação respeitantes aos procedimentos e sua aplicação.

De forma a prevenir, eliminar ou apenas reduzir os perigos que podem vir a contaminar o género alimentício durante o seu processo produtivo e posterior distribuição, devem ser tidos em conta pré-requisitos que uma vez contemplados permitiram a aplicação efetiva do sistema HACCP. Os pré-requisitos controlam os perigos associados ao meio envolvente ao processo de produção do género alimentício, enquanto que o sistema HACCP controla os perigos associados ao processo de produção (ASAE, 2015).

6.1 Pré-requisitos

6.1.1 Instalações

Segundo Baptista e Linhares, as estruturas devem ser projetadas de forma a:

- Possibilitar a correta instalação dos equipamentos;
- Facilitar a realização das operações de produção, nas condições de temperatura e ventilação adequadas;
- Facilitar todas as operações de higienização;
- Minimizar a entrada e crescimento de pragas.

6.1.2 Controlo de água

O abastecimento de água no setor da restauração deve ser realizado apenas com água potável. Segundo o Decreto-Lei n° 236/98, de 1 de agosto, alterado pelo Decreto-Lei n°243/2001 de 5 de setembro, a água utilizada deve garantir a não contaminação dos gêneros alimentícios. Desta forma deve se assegurar que a água respeita os valores legislados para o efeito.

6.1.3 Resíduos

Os resíduos alimentares devem ser colocados em contentores destinados para o efeito e estarem sempre fechados. A concepção e utilização dos locais de armazenagem de dos resíduos alimentares devem permitir boas condições de limpeza e impedir o acesso de animais e a contaminação dos alimentos, da água potável, dos equipamentos e instalações. Todas as águas residuais devem ser eliminadas de um modo higiénico e respeitador do ambiente e não devem constituir uma fonte de contaminação [Regulamento (CE) n°853/2004 de 29 de abril, anexo II, capítulo VI].

6.1.4 Controlo de fornecedores

Os fornecedores, quer de produtos alimentares, quer de produtos não alimentares, devem ser controlados, com o objetivo de conseguir um grau elevado de qualidade dos produtos e serviços. A

qualidade dos produtos finais está diretamente relacionada com a qualidade das matérias-primas que estes fornecem, e avaliando e classificando os fornecedores torna-se mais fácil uma posterior seleção.

6.1.5 Controlo de pragas

Um dos problemas que surge nos estabelecimentos de restauração é a presença de insetos e roedores. A contaminação dos alimentos por parte destes animais pode ocorrer através da introdução dos seus excrementos nos alimentos ou pela transmissão de patogénicos pelo simples contato com os alimentos. A presença de pestes nos estabelecimentos é algo admissível do ponto de vista higiénico e de segurança alimentar.
As instalações devem ser protegidas contra a entrada e permanência de insetos, roedores e outras pragas devendo, sempre que forem observados sinais da sua presença solicitar-se desinfestações.

O controlo de pragas tem obrigatoriamente um caráter preventivo, significando que não se deve esperar pelos sinais da presença de pragas para atuar.
Sempre que se proceder a desinfestações, o responsável pela unidade deverá tomar as medidas necessárias para evitar a contaminação dos alimentos, utensílios e equipamentos, uma vez que os produtos químicos utilizados podem ser tóxicos para o homem (Baptista e Linhares, 2005).

6.1.6 Plano de higienização

Um plano de higienização consiste num documento onde estão definidos os locais, equipamentos, produtos, frequência e pessoa responsável pela higienização nas instalações. Este é um documento essencial para que a higienização seja feita de forma correta. De forma mais pormenorizada, e segundo Baptista e Linhares (2005), para se elaborar um plano de higienização devem ter-se em atenção determinados fatores, como:

- Assegurar a cobertura de todas as áreas das instalações e de todos os equipamentos e utensílios relevantes;
- Discriminar os procedimentos de limpeza e desinfeção para todos os equipamentos, utensílios e áreas, descrevendo o modo de realização das actividades, nomeadamente no que respeita aos produtos químicos, à concentração das soluções e ao modo de aplicação;
- O conhecimento dos produtos químicos a utilizar, principalmente em termos de cuidados de saúde e segurança no seu manuseamento;
- Procedimentos de verificação, de forma a avaliar a eficácia do plano em causa;
- A realização de registos que evidenciem de todas as actividades desenvolvidas.

6.1.7 Formação

A formação em higiene e segurança alimentar tem uma importância fundamental.

Todo o pessoal deve ter consciência do seu papel e da sua responsabilidade na proteção dos alimentos de contaminações ou de deterioração. Os manipuladores de alimentos devem dispor dos conhecimentos e qualificações necessários que lhes permitam tratar os alimentos de forma higiénica. As pessoas que manuseiem substâncias químicas de limpeza, ou outros produtos potencialmente perigosos devem receber formação em técnicas de manuseamento seguro (CAC, 2003).

O nº 1 do Capítulo XII do Anexo II do Regulamento (CE) nº852/2004 de 29 de abril, determina que os operadores das empresas do setor alimentar devem garantir que o pessoal que manuseia os alimentos tenha instrução e/ou formação em matéria de higiene dos géneros alimentícios.

7. Etapas do processo de confeção de refeições

7.1 Recepção

No setor de restauração a variedade de produtos utilizados é muito diversa, o que torna necessário selecionar fornecedores de qualidade e de confiança, que ofereça garantias que os seus produtos são de qualidade.

A qualidade que se pretende para o produto final provém das matérias primas utilizadas, por isso é necessário ter cuidados específicos na recepção das mesmas.

O responsável pela recepção de mercadoria tem de ser conhecedor das características de qualidade dos géneros alimentícios que recebe de forma a assegurar que a matéria prima que se obtém é na realidade a pretendida.

O responsável pela qualidade deverá fazer um controlo da qualidade às matérias primas e, tem o poder de rejeitar os géneros alimentícios, quando as condições previamente estabelecidas não forem respeitadas. Do controlo realizado deve fazer parte um controlo quantitativo e um controlo qualitativo.

O controlo quantitativo consiste em verificar se as quantidades e os produtos recebidos estão de acordo com a nota de encomenda. Relativamente ao controlo qualitativo, este exige que sejam verificados diversos parâmetros, entre os quais, temperatura dos produtos, integridade das embalagens, rotulagem, sinais de deterioração dos produtos alimentares, entre outros (Baptista e Linhares, 2005; Manual das boas práticas, 2008).

7.2 Armazenagem

O adequado armazenamento dos alimentos é fundamental para a manutenção de higiene e segurança alimentar de todos os produtos. Devem ser asseguradas, as temperaturas ideais de armazenamento, humidade relativa, rotação de stocks, conveniente circulação de ar, isolamento de produtos que transmitem odores, proteção contra a ação direta da luz solar e condições de higiene do local de armazenamento. A falha de qualquer processo pode tornar os alimentos impróprios para consumo ou reduzir significativamente o tempo de vida útil dos alimentos, uma vez que os microrganismos podem ter condições para se desenvolver mais rapidamente.

O armazenamento a baixas temperaturas tem como objetivo prolongar a vida útil dos alimentos minimizando as reações de degradação e limitando o crescimento microbiológicos (Baptista e Linhares, 2005; Manual das boas práticas, 2008).

7.3 Descongelação

A descongelação correta dos alimentos é um fator importante na higiene e segurança alimentar.

Os produtos devem ser totalmente descongelados antes de qualquer tratamento posterior. Caso contrário, leva a que as temperaturas no interior do alimento durante a confeção não atinjam valores seguros. Desta forma, os alimentos podem ser colocados a descongelar com uma antecedência máxima de 72 horas para que estejam totalmente descongelados no momento da confeção. À exceção dos legumes e de produtos de pequenas dimensões (batatas pré-fritas, rissóis e pastéis de bacalhau) que não necessitam ser descongelados.

A descongelação da carne e do peixe deve efetuar-se sempre que possível em câmaras de refrigeração distintas. No caso de não ser possível os produtos devem ser protegidos de forma a que não haja contaminações cruzadas. Os produtos em descongelação não devem ficar em contacto com o suco resultante da descongelação, recomenda-se que sejam colocados em grelhas ou tabuleiros que permitam que os sucos escorram.

É importante salientar que um produto depois de descongelado não poderá voltar a ser congelado. Um produto descongelado atinge uma temperatura que permite o desenvolvimento de microrganismos. Caso o produto seja novamente congelado, até que atinja temperaturas de congelação, há crescimento microbiano. Aquando uma posterior descongelação, o alimento pode atingir níveis inaceitáveis que colocam em causa a segurança do consumidor (Baptista e Linhares, 2005; Manual das boas práticas, 2008).

7.4 Condições gerais de preparação de alimentos

Nas zonas de preparação de alimentos, as tarefas devem ser devidamente organizadas de modo a que a preparação ocorra sem pôr em causa a segurança e higiene dos alimentos, uma vez que a preparação dos alimentos é feita a temperatura ambiente, sendo também propícia a contaminação cruzada (Baptista e Linhares, 2005).

De forma a evitar assim a contaminação de alimentos cozinhados e pré-cozinhados por contacto direto e indireto com o pessoal, ou com matérias primas num estado de preparação, deve organiza-se o serviço de forma a seguir o sistema de "marcha em frente", não permitindo que os alimentos prontos a servir se cruzem com os alimentos que estão a chegar para serem preparados.

Os utensílios e equipamentos devem estar devidamente lavados e desinfetados antes de iniciar a preparação dos alimentos.

Após a confeção deve-se reduzir ao máximo a manipulação dos alimentos, para que não haja recontaminação do produto cozinhado.

Preparação de alimentos crus

Os alimentos que serão servidos em cru devem ser manipulados em zonas diferentes daquelas onde se manipulam alimentos cozinhados. Nos casos em que a disposição do local não permita, as operações devem ser separadas no tempo por uma fase de limpeza e desinfeção. Da mesma forma, não é permitida que a mesma faca ou tábua entre em contacto simultaneamente com alimentos crus e confecionados ou com alimentos de origem animal e vegetal.

Preparação de hortofrutícolas

Os produtos hortofrutícolas não despertam, de um modo geral, tanto receio em termos de segurança alimentar, quando comparados com outros produtos como carnes, pescado ou ovos. No entanto, intoxicações alimentares podem resultar devido a incorretos procedimentos de higienização e preparação. Tal, deve-se ao facto da maioria destes produtos serem consumidos sem sofrerem qualquer tipo de processamento térmico (Baptista e Linhares, 2005).

Em relação às frutas, estas devem ser devidamente lavadas de modo a remover sujidade e alguns possíveis contaminantes (pesticidas), mas não necessitam de desinfetante.

Preparação de carnes

Os procedimentos para a preparação de carnes, tais como lavagem, corte e tempo de espera para confeção, deverão ter uma sequência que permita assegurar que os produtos perecíveis crus de origem animal não estejam expostos mais que uma hora à temperatura de risco. As cantinas não devem adquirir carne fresca para congelar, devem adquirir o produto ultracongelado e acondiciona-lo na câmara de conservação de congelados com o rótulo, até ser consumido.

Preparação de pescado

Os procedimentos de preparação de pescado, tais como, evisceração, remoção de cabeças, descamação, lavagem, corte e tempo de espera para confeção, deverão ter uma sequência que permita assegurar que o pescado não esteja exposto mais que 30 minutos à temperatura de risco. Depois da preparação deve seguir-se a lavagem do pescado com água corrente. Por fim, o pescado deve ser mantido em ambiente refrigerado devidamente acondicionado até à sua confeção.

Sobras

O termo sobras aplica-se aos alimentos que foram confecionados em excesso, que não chegaram a ser servidas e que sobraram. O tratamento das sobras deve ser realizado com a máxima atenção.

As sobras podem ser reaproveitadas se a cadeia de frio for assegurada, ou seja, não podem permanecer à temperatura ambiente. Quando quentes devem ser devem ser rapidamente arrefecidas até uma temperatura de 3°C, permanecendo em ambiente refrigerado em recipientes próprios e devidamente cobertos. Não devem ser reaproveitadas em conjunto com novos produtos. Quando se guardam as sobras deve-se colocar uma indicação que explicite o que contém e a data de produção. Todas as sobras que já tenham sido conservadas e que foram pela segunda vez à temperatura ambiente terão de ser rejeitadas (Baptista e Linhares, 2005).

Controlo da temperatura na confecção

A confeção dos alimentos é uma etapa muito importante para a segurança alimentar uma vez que permite destruir os microrganismos presentes nos alimentos. Para que a destruição seja assegurada deve-se alcançar, durante o processo de confeção, uma temperatura superior a 75°C durante pelo menos 2 minutos. Além da temperatura, outro fator a ter em consideração é o tempo a que os alimentos estão submetidos à temperatura de confeção. Desta forma, é importante aplicar um correto binómio tempo/temperatura para assegurar a eliminação dos microrganismos ou pelo menos reduzir para valores admissíveis (Baptista e Linhares, 2005). A tabela 11 apresenta os binômios mínimos de tempo/temperatura que devem ser cumpridos durante a confeção de diferentes tipos de alimento.

Tabela 11 - Temperaturas internas mínimas de segurança (Baptista *et al.,* 2005).

Alimento	Temperaturas Internas/tempos de confeção
Carnes recheadas, massas e recheios que contenham carne, aves ou peixes Aves (frango, peru, pato, etc.)	75°C/15 s
Porco, bacon, salsichas fresca	63°C/15 s
Carnes picadas ou desfiadas, peixes desfiado, salsichas	68°C/15 s
Carne assada de porco ou vaca	63°C/4 min
Bifes de vaca, carneiro, vitela, veado Peixe e marisco	63°C/15 s
Vegatais a servir a quente	60°C/15 s
Ovos e produtos qe contenham ovos frescos	68°C/15 s
Alimentos pré-cozinhados Qualquer alimento de risco elevado, confecionado no microondas	75°C/15 s

7.5 Exposição

Os alimentos expostos devem estar protegidos de forma a minimizar qualquer risco de contaminação que os torne impróprios para consumo ou perigosos para a saúde (Portaria n.° 329/75, de 28 de maio).

Os locais de exposição das refeições devem ser expositores ou vitrinas que protejam as mesmas de insetos, contacto direto com o público ou qualquer outro tipo de contaminante.

Em cantinas escolares é necessário fornecer num curto espaço de tempo, um grande número de refeições. Este facto obriga à preparação das refeições com alguma antecedência o que aumenta o risco de toxinfeção alimentar. As refeições confecionadas com antecedência deverão ser acondicionadas a temperaturas adequadas dependendo do alimento em questão.

As refeições destinadas à conservação pelo calor devem ser mantidas em equipamentos (estufas ou banho-maria), cujas temperaturas devem estar reguladas para os 80°C ou 90°C, de forma a garantir que os alimentos se mantêm no mínimo a 63°C.

Caso os alimentos se destinem a ser conservados através de um processo de refrigeração, tais como saladas de alface e tomate, devem ser acondicionadas após a sua confeção a uma temperatura de 4°C (Baptista e Linhares, 2005; Manual das boas práticas, 2008).

7.6 Empratamento

O empratamento é uma etapa onde é possível a recontaminação ou a multiplicação de eventuais microrganismos, que tenham sobrevivido à confeção propriamente dita, caso não se cumpram os devidos cuidados. Desta forma, é crucial que sejam cumpridas as normas de higiene e segurança alimentar, e se respeite os intervalos de temperatura a que os alimentos se devem encontrar (Baptista e Linhares, 2005). Os alimentos nunca deverão ser tocados diretamente com as mãos, deve-se usar sempre pinças, colheres ou espátulas para o efeito. Caso o empratamento seja realizado pelo consumidor, por exemplo em buffet ou mesmo o serviço de saladas, os consumidores devem ter à sua disposição utensílios para que se possam servir.

8. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo global:

- A avaliação microbiológica de refeições servidas na cantina Universitária.

Os objetivos específicos são:

- Quantificação de microrganismos indicadores de boas práticas de confeção, armazenamento, manipulação e higiene (Microrganismos mesófilos, Coliformes totais e fecais, E. coli, *S. aureus,* Bolores e Leveduras);
- Verificar se existe diferenças significativas nas contages de microrganismos em diferentes tempos de recolha das amostras.

9. Materiais e métodos

9.1 Materiais

No que diz respeitos aos meios de cultura, foram utilizados os discriminados na tabela 12.

Tabela 12 - Meios de cultura para a pesquisa de microrganismos.

Meio de cultura	Pesquisa	Morfologia das colónias caracteristicas
Triptona sal	(Diluente para crescimento e pré-enriquecimento)	-
PCA (Plate Count Agar)	Contagem de microrganismos a 30°C	colónias de cor clara
TBX (Tryptone Bile Glucuronide)	Contagem de *Escherichia coli*	Colónias azuis
VRBL (Violet Red Bile Agar)	Contagem de Coliformes totais	Colónias ligeiramente vermelhas/ cor-de-rosa
Baird-Parker	Contagem de *Staphylococcus* com coagulase positiva	Pretas com halo transparente
Rose Bengal	Contagem de Bolores e levaduras	Bolores: colónias com micélio Leveduras: colónias pequenas, lisas ou rugosas, de cor uniformes, opacas ou brilhantes

O material utilizado foi o material de uso comum em laboratório de microbiologia, e todo ele foi lavado, esterilizado no autoclave, à temperatura de 121°C, e seco na estufa. Foi também utilizado material esterilizado descartável.

9.2 Métodos

9.2.1 Definição do plano de amostragem

Seleção do local de recolha e meses de realização

A cantina alvo de estudo foi o Restaurante Luzio-Vaz situado no polo III, polo da saúde.

A recolha das amostras foi efetuada nos meses de fevereiro e março, duas vezes por semana.

Classificação das amostras

Com a finalidade de avaliar a qualidade microbiológica de refeições servidas, na cantina universitária Luzio Vaz, à comunidade universitária, foram recolhidas amostras dos pratos de carne e peixe (Grupo I – Alimentos cozinhados) e de saladas (Grupo III – Alimentos não cozinhados), num total de 78 amostras, não tendo sido recolhidas amostras do Grupo II.

As preparações culinárias selecionadas foram agrupadas de acordo com os "Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração" do INSA (Tabela 13) do seguinte modo (Tabela 14):

Tabela 13 - Grupos de alimentos pronto a comer.

Grupo	Produto
Grupo I	Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces com ingredientes totalemente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas ou tratadas po radiação ionizante, de produtos UHT e de maionese industrializada.
Grupo II	Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces cozinhadas adicionadas de ingredientes crus e (ou com flora especifica própria
Grupo III	Saladas/Vegetais/Frutos crus

As amostras recolhidas estão descritas na tabela 14.

Tabela 14 - Designação das preparações culinárias recolhias para amostra.

Grupo de acordo com os valores-guia do INSA	Designação da preparação culinária
I	Abrotia com arroz branco Almondegas com esparguete Carapau assado com batata cozida Feijoada Filetes com arroz branco Frango assado com arroz Hamburgeres Lombo com batata frita Lulas com batata cozida Massada de lulas Massada de peixe Pataniscas com arroz de feijão Pescada no forno com batata assada Rambone com batata assada Rancho Solha com arroz branco Solha com puré *Strogonofe* com arroz branco Tortilha
III	Alface Alface com cenoura Alface com tomate

Em 2005 foram publicados pelo INSA valores-guia para a apreciação dos resultados de análises microbiológicas quantitativas e qualitativas em alimentos prontos a consumir servidos na restauração (Santos et al., 2005). As análises microbiológicas realizadas neste estudo tiveram em conta os critérios microbiológicos dos valores-guia elaborados pelo INSA e encontram-se explicitados na tabela 15.

Tabela 15 - Valores Guia para a avaliação microbiológica de alimentos prontos a comer (Santos, I, *et al.*, 2005).

Microrganismos	**Grupo de alimentos**	**Qualidade Microbiológica (ufc/g)**			
		Satisfatório	**Aceitável**	**Não satisfatório**	**Inaceitável/ Potencialmente perigoso**
Microrganismos a 30°C	1	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$>10^5$	
	3	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^5$	$>10^6$	
Leveduras	1 e 2	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^5$	
Bolores	1 e 2	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	#
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3$	
Coliformes totais	1	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	NA
	2	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3$	
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	
E. coli	1 e 2	<10	NA	≥ 10	
	3	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$\geq 10^2$	
Patogénicos					
Staphylococcus coagulase positiva	1, 2 e 3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$

Legenda:

- Equacionado caso a caso
NA - Não aplicável

A criação de limites e valores de referência para as determinações microbiológicas, permitiram o estabelecimento de quatro níveis de "Qualidade Microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer", conforme mostra a tabela 16 (Santos *et al.,* 2005):

Tabela 16 - Níveis de Qualidade microbiológica de alimentos prontos a consumir (Santos, I. *et al*., 2005)

Níveis de Qualidade	Significado
Satisfatório	Resultados analíticos indicam uma boa qualidade microbiológica
Aceitável	Resultados analíticos indicam que o produto se encontra dentro dos limites estabelecidos
Não Satisfatório	Resultados analíticos indicam que o produto não satifaz um ou mais dos valores estabelecidos
Inaceitável/ Potencialmente perigoso	Resultados analíticos indicam a presença de microrganismos patogénicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde

O número total de amostras recolhidas por grupo é dado pela tabela 17.

Tabela 17 - Número de amostras recolhidas por Grupo de alimento.

Grupo de Alimentos	Número de amostras
Grupo I	52
Grupo II	0
Grupo III	26
TOTAL	78

9.3 Avaliação microbiológica

As análises foram realizadas em todas as amostras recolhidas. Foram avaliados microrganismos indicadores de qualidade comercial, microrganismos aeróbios a 30°C, bolores e leveduras, e de qualidade sanitária coliformes totais, coliformes fecais, *E. coli* e *S. aureus*, fazendo um total de 549 análises microbiológicas. Os parâmetros analisados são os que igualmente são analisados, regularmente, pelo gabinete de Nutrição e Controlo Alimentar dos Serviços de ação Social da Universidade de Coimbra.
As análises microbiológicas foram efetuadas de acordo com as Normas Portuguesas e Europeias.

- Contagem de mesófilos (NP 4405:2002)
- Contagem de Coliformes totais (ISO 4832)
- Contagem de *E. coli* (ISO 16649-2)
- Contagem de *Sthapylococcus* com coagulase positiva (ISO 6888-1:1999)
- Contagem de bolores e leveduras (NP 3277:1987)

9.3.1 Colheitas

A colheita das amostras para análise microbiológica foi efetuada com sacos de *stomacher* esterilizados e com utensílios, garfo e faca, esterilizados. Obedeceu-se a todos os cuidados de forma a evitar a contaminação dos alimentos durante a recolha conforme os procedimentos definidos na NP-1828. As amostras foram recolhidas da vitrine onde as refeições se encontram prontas a serem servidas. No caso dos pratos quentes, as refeições encontram-se expostas à temperatura do banho-maria, enquanto as saladas encontram-se à temperatura ambiente.

9.3.1.1 Tempos de recolha

As amostras foram recolhidas em tempos distintos. As primeiras amostras foram recolhidas às 12h00 (t=0), hora em que a cantina é aberta à comunidade escolar e em que inicia o serviço de refeições.

Posteriormente foram recolhidas amostras às 14h00 (t=1), hora perto do termino do serviço das refeições.

9.3.1.2 Transporte das amostras para análise microbiológica

Imediatamente após a recolha, as amostras foram transportadas até ao laboratório de microbiologia da Faculdade de Farmácia, em mala térmica, a uma temperatura aproximada de 4°C.

9.3.2 Preparação das amostras para análise

No laboratório, em condições de assepsia, foram pesadas 10 gramas de cada refeição/alimento que foram adicionadas a 90 mililitros de triptona sal. A solução foi homogeneizada no *stomacher* e obteve-se assim a diluição 10^{-1} (suspensão mãe). A partir da diluição 10^{-1} foram feitas diluições decimais seriadas. A diluição 10^{-2} foi obtida retirando 1 mililitro da diluição 10^{-1} para um tubo que continha 9 mililitros de triptona sal. As diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram obtidas segundo o mesmo procedimento. Em seguida, procedeu-se à homogeneização das diluições no *vortex*. O procedimento repetiu-se para todas as amostras de refeição recolhidas para análise.

9.3.3 Realização da análise microbiológica

Contagem de microrganismos aeróbios a 30°C (NP – 4405:2002)

Para a contagem de microrganismos aeróbios a 30°C pipetou-se 1 ml de cada diluição (10^{-1}, 10^{2}, 10^{-3} e 10^{-4}) para cada caixa de petri esterilizada. Incorporou-se posteriormente o meio PCA, cerca de 20 ml. De forma a promover a homogeneização das incorporações agitaram-se as placas em movimentos circulares e esperou-se o tempo de solidificação do meio para inverter as placas e incubá-las. As caixas foram incubadas a 30°C durante 48 a 72 horas. As colónias características apresentando-se de cor clara.

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

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

Σ c – Soma das colónias em todas as placas contadas

V – Volume de inóculo semeado em cada placa

n1 – número de placas da primeira diluição contada

n2 – número de placas da segunda diluição contada

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

Contagem de bolores e leveduras (NP - 3277:1987)

O meio de cultura utilizado para a pesquisa de bolores e leveduras foi o meio Rose Bengal agar. A partir da diluição 10^{-1}, distribuiu-se 1 mililitro por 5 caixas de petri (0,2 mililitros por cada caixa de petri). Em seguida com um espalhador esterilizado (uma pipeta pasteur de vidro dobrada ao calor) espalhou-se o inóculo. Repetiu-se o procedimento para a diluição 10^{-2}. As placas foram a incubar à

temperatura de 25 °C durante 5 dias. As colónias de bolores apresentam micélio, o que as permite distinguir das colónias de leveduras. Estas apresentam colónias pequenas, lisas ou rugosas, de cor uniformes, opacas ou brilhantes A contagem microbiológica expressou-se em unidades formadoras de colónias por grama (UFC/g).

Contagem de coliformes totais (ISO - 4832)

Para a pesquisa de coliformes totais pipetou-se 1 ml da diluição 10^{-1} e 1 ml da diluição 10^{-2} para as respetivas caixas de petri. Adicionou-se posteriormente a 1ª camada do meio VRBL e agitaram-se as placas em movimentos circulares. Quando a 1ª camada solidificou, adicionou-se a 2ª camada de meio VRBL, de forma a criar anaerobiose. As placas foram incubadas a 30°C durante 24 horas. As colónias de coliformes apresentam-se ligeiramente vermelhas/cor-de-rosa. A contagem expressou-se em unidades formadoras de colónias por grama (UFC/g).

Contagem de *Escherichia coli* (ISO – 16649-2)

A contagem de *E. coli* foi efetuada em caixas de petri, inoculadas com 1 ml da diluição 10^{-1} das amostras de cada alimento. O inóculo foi semeado por incorporação do meio TBX. De forma a promover a promover a homogeneização das incorporações agitaram-se as caixas em movimentos circulares. Após a primeira camada do meio solidificar, adicionou-se a 2ª camada do meio TBX, de forma a criar anaerobiose. As culturas foram a incubar a 37°C durante 24 horas. O resultado é obtido diretamente pela contagem das colónias características, as de cor azul. A contagem microbiológica expressou-se em unidades formadoras de colónias por grama (UFC/g).

Contagem de *Staphylococcus* com coagulase positiva (ISO 6888-1:1999)

A detecção de *S. aureus* foi efetuada em Meio Baird Parker, previamente fundido, enriquecido com gema de ovo e arrefecido. Os meios foram inoculados por espalhamento com 0,1 ml da diluição 10^{-1}. As culturas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Para a pesquisa de Estafilococos coagulase positiva, retirou-se uma porção de cada uma das colónias selecionadas (colónias pretas com halo) e semeou-se em tubos com BHI (Brain Heart Infusion). Incubou-se a 37°C durante 20 a 24 horas. Juntou-se assepticamente 0,1 ml de cada cultura a 0,3 ml de plasma de coelho em tubos de hemólise esterilizados e incubou-se a 37°C. Examinou-se a coagulação do plasma após 4 a 6 horas. Se necessário, reincubar e examinar de novo às 24 horas. Considera-se a reacção coagulase positiva quando o coágulo ocupa mais de ¾ do volume inicialmente ocupado pelo líquido. A contagem microbiológica expressou-se em unidades formadoras de colónias por grama (UFC/g).

10. Resultados e discussão

O tratamento de dados foi realizado através de análise quantitativa, descritiva e comparativa dos resultados recorrendo ao programa informático "Statistic Package for the Social Sciences" (SPSS), versão 20.0 for Windows.

10.1 Estatística descritiva: caraterização da amostra em estudo

Numa primeira fase efetuou-se uma breve análise exploratória dos dados completos, estatística descritiva, de modo a caracterizar a nossa amostra.

Através da leitura da tabela 19 podemos observar o valor mínimo e máximo das contagens, bem como a média e a mediana das amostras do Grupo I e Grupo III, para cada parâmetro.

Tabela 18 - Estatística descritiva dos resultados obtidos das análises microbiológicas.

Microrganismos	Grupo de alimento	Mínimo (ufc/g)	Máximo (ufc/g)	Média (ufc/g)	Mediana (ufc/g)
Microrgansimos a 30°C	I	0,00E+00	8,00E+04	2,38E+03	0,00E+00
	III	0,00E+00	2,90E+05	1,82E+04	2,53E+03
Bolores	I	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	III	0,00E+00	1,54E+03	4,05E+02	2,09E+03
Leveduras	I	0,00E+00	2,09E+02	6,29E+00	0,00E+00
	III	0,00E+00	4,47E+04	9,61E+03	6,70E+03
Coliformes Totais	I	0,00E+00	1,35E+03	3,41E+01	0,00E+00
	III	0,00E+00	1,20E+04	1,14E+03	1,64E+02
Coliformes Fecais	I	0,00E+00	1,08E+03	2,46E+01	0,00E+00
	III	0,00E+00	1,06E+02	6,99E+01	0,00E+00
Escherichia coli	I	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	III	0,00E+00	1,00E+02	4,54E+00	0,00E+00
Staphylococcus aureus	I	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	III	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Através da leitura da tabela 18, pode observar-se que os valores da média e mediana, da contagem de **microrganismos a 30°C**, referentes ao Grupo I e Grupo III são $2,38x10^3$ ufc/g e 0,0 ufc/g, $1,82x10^4$ e $2,53x10^3$ ufc/g respectivamente.

Para os alimentos do Grupo I, num estudo realizado por Legnami *et al.* (2004), em estabelecimentos de restauração coletiva, na região de Ferrara (Itália), obtiveram-se valores de contagens de microrganismos a 30°C entre 0,0 ufc/g e $4,0 \times 10^8$ ufc/g, valores superiores aos do nosso estudo. Relativamente ao Grupo III, o estudo de Legnami *et al.* (2004) obteve resultados entre $1,1x10^4$ e $7,2x10^7$, contagens estas também superiores às do nosso estudo.

De acordo com Zhuang *et al.* (2003) o número de mesófilos presente em vegetais varia entre $1,0x10^4$ ufc/g e $1,0x10^6$ ufc/g. Ainda outro estudo efetuado em Johanesburgo, África do Sul, obteve valores de pesquisa de mesófilos de $1,0x10^7$ em saladas de vegetais (Chistison *et al.*, 2007).

Estas diferenças podem justificar-se pela má lavagem e desinfeção dos produtos, bem como pela baixa qualidade do ar dos locais de processamento e de exposição (Salustiano *et al.*, 2003).

A avaliação microbiológica de preparações culinárias em diferentes tempos de exposição, realizada por Ferreira, J. (2014), revelou para o Grupo I, o valor mínimo e máximo de 0,0 ufc/g e $3,1x10^{12}$, respetivamente, e para o Grupo III, 0,0 ufc/g e $6,7x10^9$. Estes valores são significativamente superiores aos do presente estudo.

No que diz respeito às contagens dos **bolores** constata-se que, no Grupo I, alimentos cozinhados, nenhuma das amostras demonstrou crescimento, enquanto que no Grupo III registou-se uma média de $4,05x10^2$ufc/g de alimento e mediana de $2,09x10^2$ ufc/g de alimento. ´O valor mínimo registado foi de $9,09x10^0$ ufc/g e o valor máximo foi de $1,54x10^3$.

Os resultados obtidos foram inferiores aos de Riser *et al.* (1984) que encontrou em alfaces contagens de bolores que variam entre $1,2x10^2$ e $5,3x10^6$.

A contagem de **leveduras** indicou para o Grupo I um valor mínimo de máximo de 0,0 ufc/g e $2,09x10^2$ respetivamente. O grupo III registou um valor mínimo de $4,27x10^2$ ufc/g e $4,47x10^4$ ufc/g.

Segundo o pesquisador já referido Riser *et al.* (1984), a contagem de leveduras em alface varia entre $6,9x10^2$ ufc/g e $2,3x10^6$, uma maior gama de valores, comparada com obtida no presente estudo.

Nos resultados da pesquisa de **coliformes totais** para as amostras do Grupo I e Grupo III, as contagens variam no intervalo 0,0 ufc/g e $1,35x10^3$, e 0,0 ufc/g e $1,20x10^4$, respetivamente.

As contagens obtidas por Legnami *et al.* (2004), referentes às amostras do Grupo I encontram-se entre 0,0 ufc/g e $7,5x10^5$. Verifica-se neste caso uma diferença de duas ordens de magnitude logarítmica em relação aos nossos resultados.

A presença de **coliformes fecais** foi identificada em 4 amostras do Grupo I e em 12 amostras do Grupo III (ver Anexo E), registando se uma média de coliformes totais no Grupo III de $6,99x10^1$ ufc/g, superior à média do Grupo III que foi de $2,46x10^1$ ufc/g.

Em relação aos resultados obtidos para a contagem de ***E. coli***, observa-se que no grupo I não se obteve qualquer valor de contagem, no grupo III apenas três amostras indicaram a presença de *E. coli*, sendo o valor máximo registado foi de $1x10^2$ ufc/g (ver Anexo F). Estes resultados indicam a ausência da bactéria em 96,15% das amostras analisadas.

Legnami *et al.* (2003) obteve contagens compreendidas entre 0,0 ufc/g e $1,5x10^6$ para alimentos cozinhados e 0,0 ufc/g e $1,0x10^3$ para alimentos pertencentes ao Grupo III. Comparando os valores máximos obtidos neste estudo com os valores de Legnami, verifica-se que apresentamos contagens inferiores em ambos os Grupos de alimentos.

Ainda assim, a presença desta bactéria poderá traduzir contacto dos alimentos com superfícies e equipamentos contaminados e mãos de manipuladores (Caponigro *et al.*, 2010).

Da pesquisa de ***S. aureus*** verificou-se que nenhuma das amostras analisadas indica a presença de *S. aureus*.

No estudo de Christison e*t al.* (2007) a contaminação de sandes e saladas foi de $1,0x10^2$ ufc/g e $1,0x10^1$ ufc/g respetivamente. Segundo Fang *et al.* (2003), o número de bactérias presentes em sandes variou entre $2,0x10^2$ ufc/g e $1,2x10^5$ ufc/g, valores bem díspares dos resultados obtidos no presente estudo.

A diferença entre o presente estudo e o estudo referido poderá significar a existência de boas práticas de manipulação, limpeza e desinfeção, dificultando a contaminação cruzada (Frang e*t al.*, 2003). Além disso, no caso das amostras do Grupo III, saladas, os resultados obtidos podem justificar-se pelas temperaturas baixas de armazenamento em que são mantidas, evitando assim, a proliferação destas bactérias.

O Grupo III é o que apresenta contagens mais elevadas apresentando diferenças significativas em relação ao Grupo I, o que está de acordo com o esperado se o processo de lavagem e desinfeção não for eficaz. Uma vez que os vegetais são produtos crus de origem agrícola é expectável que contenham microrganismos, incluindo patogénicos. Na realidade a contaminação dos vegetais reflete a microflora do ambiente em que estes são cultivados (Tauxe e*t al.,*1997).

As amostras do Grupo I apresenta contagens inferiores às do Grupo III, uma vez que estes alimentos sofrem tratamento térmico que permite eliminar os microrganismos neles presentes.

10.2 Análise comparativa: Relação entre as variáveis "contagem de microrganismos" e " tempos de recolha"

Nesta fase separamos os dados por Grupos de alimentos e analisamos separadamente cada grupo no que respeita à relação existente entre a variável tempos de recolha e a contagem de cada microrganismo efetuada.
Os dois tempos de recolha das amostras têm como objetivo verificar se a conservação dos gêneros alimentícios até ao momento de serem servidos é realizada de forma adequada.

Em primeiro lugar foi necessário verificar se cada grupo apresentava uma distribuição normal para todas as variáveis de contagem de microrganismos, através do teste de Kolmogorou – Smirnov e constatamos que todas as variáveis assumiam uma distribuição normal.

Desta forma, aplicamos os resultados obtidos das análises ao teste T, de forma a verificar se existe diferenças significativas entre as médias das várias amostras, com um nível de significância de 5%.

Testaram-se as hipóteses:

H0: Não existe diferenças significativas a nível microbiológico das refeições servidas em t0 e t1

H1: Existem diferenças significativas a nível microbiológico das refeições servidas em t0 e t1

Através do teste T constatamos que, comparando:

A contagem de mesófilo, grupo I, em t0 e t1, obtivemos um p-value= 0,412>0,05

A contagem de mesófilo, grupo III, em t0 e t1, obtivemos um p-value= 0,345>0,05

A contagem de bolores, grupo III, em t0 e t1, obtivemos um p-value= 0,808 >0,05

A contagem de leveduras, grupo I, em t0 e t1, obtivemos um p-value= 0,646>0,05

A contagem de leveduras, grupo III, em t0 e t1, obtivemos um p-value= 0,851>0,05

A contagem de coliformes totais, grupo I, em t0 e t1, obtivemos um p-value= 0,240>0,05

A contagem de coliformes totais, grupo III, em t0 e t1, obtivemos um p-value= 0,576>0,05

A contagem de coliformes fecais, grupo I, em t0 e t1, obtivemos um p-value= 0,262>0,05

A contagem de coliformes fecais, grupo III, em t0 e t1, obtivemos um p-value= 0,257>0,05

A contagem de *E. coli,* grupo III, em t0 e t1, obtivemos um p-value= 0,328>0,05

Para *S. aureus* não se realizou o teste uma vez que não se obteve contagens diferentes de 0ufc/g assim como para Bolores e *E. coli* do grupo I.

Aceitando um α de 0,05 concluindo-se assim que as contagens dos microrganismos, para todos os parâmetros analisados, em ambos os tempos de recolha e grupos analisados, são estatisticamente iguais, para um nível de significância de 5%.

Numa segunda fase, após leitura e interpretação dos resultados as unidades amostrais foram classificadas em satisfatório, aceitável e não satisfatório de acordo com os valores-guia do INSA.

10.3 Avaliação da Qualidade Microbiológica das Preparações Culinárias

Contagem de microrganismos a 30°C

Tabela 19 - Classificação das amostras relativas ao parâmetro Microrganismos a 30°C.

			Classificação de acordo com os "Valores Guia INSA"		
Microrganismos	**Grupo**	**Tempo**	**Satisfatório**	**Aceitável**	**Não-satisfatório**
Microrgansimos a 30°C	Grupo I	t0	17 65,4%	8 30,8%	1 3,8%
		t1	19 73,1%	5 19,2%	2 7,7%
		total	**69,2%**	**25,0%**	**5,8%**
	Grupo III	t0	11 84,6%	2 15,4%	0 0%
		t1	11 84,6%	2 15,4%	0 0%
		total	**84,6%**	**15,4%**	**0%**

As análises efetuadas aos alimentos do grupo I indicam que os alimentos apresentam qualidade microbiológica, a nível de microrganismos aeróbios 30°C, satisfatória/aceitável, de 69,2% e 25% respetivamente. Desta forma, cerca de 94% dos alimentos são classificados como tendo condições para serem consumidos.

Ao analisar a tabela 19, verifica-se que apenas três amostras (5,8%), do grupo I, duas das quais recolhidas em t1 e uma em t0, apresentam resultados não satisfatórios.

No grupo III, no que diz respeito à qualidade microbiológica relativa ao parâmetro de microrganismos aeróbios a 30°C, as amostras revelaram resultados satisfatórios/ aceitáveis, 84,62% e 15,38%, respetivamente, para ambos os tempos de recolha. Este resultado indica que 100% das amostras se encontram dentro dos limites satisfatórios/aceitáveis.

O estudo de análise de dados microbiológico de géneros alimentícios prontos a comer servidos, no ano de 2013, em unidades de restauração, realizado pelo INSA, indica que para o parâmetro

microrganismos aeróbios 30°C a percentagem de alimentos do Grupo I e Grupo III que apresentam qualidade satisfatória/aceitável é de 88,9% e de 77,4% respectivamente (Correia C. *et al.,* 2014).

Legnami *et al*., (2003), no estudo já referido anteriormente, indica que os alimentos pertencentes ao Grupo I e Grupo III apresentam uma percentagem de resultados satisfatório/aceitáveis 95% e 91,7% respetivamente.

Comparando os valores com os dois estudos referidos, verifica-se que os resultados do presente estudo são similares aos de Legnami *et al.* (2003), e superiores aos de Correia, C. *et al.* (2014).

A avaliação microbiológica de preparações culinárias, mantidas à temperatura ambiente, em diferentes tempos de exposição, realizada por Ferreira, J. (2014), indica para o Grupo I, relativamente ao parâmetro de microrganismos a 30°C, 10% de amostras satisfatórias, 30% de amostras aceitáveis e 60% de amostras não satisfatórias para t0, enquanto que pata t2 (equivalente ao nosso t1), a percentagem de amostras satisfatórias diminui para 5% e a percentagem de amostras não satisfatórias aumentou pata 65%. Para o Grupo III, a percentagem de amostras satisfatórias é semelhante em ambos os tempos de exposição do alimento, contudo a percentagem de aceitáveis diminui de t0 para t2, o que levou ao aumento de amostras não satisfatórias em t2.

Desta forma, comparando a avaliação microbiológica de amostras mantidas à temperatura ambiente e amostras mantidas à temperatura recomendada de exposição/conservação, verifica-se que as amostras à temperatura recomendada apresentam uma percentagem bastante inferior de amostras não satisfatórias, pelo que, a temperatura é um fator extrínseco que deve sem dúvida sem controlado uma vez que tem influência no desenvolvimento de microrganismos.

Contagem de total de bolores e leveduras

Tabela 20 - Classificação das amostras relativas aos parâmetros Bolores e Leveduras.

			Classificação de acordo com os "Valores Guia INSA"		
Microrganismos	**Grupo**	**Tempo**	**Satisfatório**	**Aceitável**	**Não-satisfatório**
Bolores	Grupo I	t0	26 100%	0 0%	0 0%
		t1	26 100%	0 0%	0 0%
		total	**100%**	**0%**	**0%**
	Grupo III	t0	4 30,8%	8 61,5%	1 7,7%
		t1	4 30,8%	7 53,8%	2 15,4%
		total	**30,8%**	**57,7%**	**11,5%**
Leveduras	Grupo I	t0	25 96,15%	1 3,8%	0 0%
		t1	25 96,2%	1 3,8%	0 0%
		total	**96,2%**	**3,8%**	**0%**
	Grupo III	t0	0 0%	13 100%	0 0%
		t1	0 0%	13 100%	0 0%
		total	**0%**	**100%**	**0%**

No grupo I, 100% das amostras denotam ausência de bolores, apresentando assim resultados satisfatórios para todas as amostras. No Grupo III, que trata de alimentos não cozinhados, 100% das amostras apresentaram crescimento de colónias de bolores (ver Anexo B), contudo apenas 3 amostras do grupo III (11,5%) mostram resultados não satisfatórios, perfazendo um total de 88,5% de amostras satisfatórias/aceitáveis. As amostras não satisfatórias dizem respeito aos alimentos Alface com cenoura (A11 e A12) e Alface com tomate (A18) (ver Anexo B). A11 e A12 foram recolhidas no mesmo dia, em t0 e t1 respectivamente o que poderá indicar que as saladas no respetivo dia não foram corretamente lavadas/desinfetadas. O facto de se verificar um aumento de amostras não satisfatórias, em t0, pode ser justificado pela contaminação dos alimentos durante a exposição.

Segundo Correia *et al.* (2014) percentagem de alimentos do Grupo I e Grupo III que apresentam qualidade satisfatória/aceitável é de 98,2% e de 85,4% respectivamente. Os valores que obtivemos são próximos dos resultados obtidos por Correia et al., contudo ligeiramente mais satisfatórios.

A contagem de leveduras indica resultados satisfatórios/aceitáveis para todas as amostras analisadas. Em relação aos resultados obtidos para a contagem de leveduras, no Grupo I, verifica-se que 96,5% das amostras apresentam resultados satisfatórios e 3,85% resultados aceitáveis, não havendo registo de amostras não satisfatórias. Este resultado é comum em t0 e t1, pelo que as condições de

armazenamento e exposição não contribuíram para a contaminação ao longo do tempo. No Grupo III, em ambos os tempos de recolha, 100% das amostras, apresentam resultados aceitáveis.

Correia *et al.* (2014) indica que os alimentos do Grupo I e Grupo III apresentam qualidade satisfatória/aceitável na ordem dos 98,9% e de 88,2% respectivamente. Tendo em conta que os resultados que obtivemos é de 100% de amostras satisfatórias/aceitáveis, podemos referir que os nossos resultados indicam alimentos com melhor qualidade microbiológica.

Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

Do total das 78 amostras analisadas, 25 indicam a presença de coliformes totais (32%), das quais 17 indicam a presença de coliformes fecais (ver Anexo D e E). Dos 25 alimentos que apresentam coliformes, 3 apresentam resultados não satisfatórios, nos quais um prato de carne, um prato de peixe e uma salada, recolhidos em t0.

Tabela 21 - Classificação das amostras relativas aos parâmetros Coliformes totais e *Escherichia coli.*

			Classificação de acordo com os "Valores Guia INSA"		
Microrganismos	**Grupo**	**Tempo**	**Satisfatório**	**Aceitável**	**Não-satisfatório**
Coliformes Totais	Grupo I	t0	23 88,5%	1 3,8%	2 7,7%
		t1	24 92,3%	2 7,7%	0 0%
		total	**90,4%**	**5,8%**	**3,8%**
	Grupo III	t0	7 53,8%	5 38,46%	1 7,7%
		t1	4 30,8%	9 69,23%	0 0%
		total	**42,3%**	**53,85%**	**3,85%**
Escherichia coli	Grupo I	t0	26 100%	0 0%	0 0%
		t1	26 100%	0 0%	0 0%
		total	**100%**	**0%**	**0%**
	Grupo III	t0	13 100%	0 0%	0 0%
		t1	12 92,3%	0 0%	1 7,7%
		total	**96,2%**	**0%**	**3,8%**

Pela tabela 21 observa-se que a pesquisa de coliformes totais n as amostras do Grupo I 90,4% apresentam classificação satisfatória, 5,8% classificação aceitável, um total de 96,2% de amostras dentro dos limites estabelecidos. As amostras responsáveis pela classificação de não satisfatórias, 3,8%, dizem respeito a alimentos recolhidos em t0, enquanto que em t1, não se verificou nenhuma

amostra não satisfatória. Estes resultados distintos entre t0 e t1, podem ser justificados pela possível contaminação através dos utensílios utilizados pelos manipuladores no início do serviço das refeições.

No Grupo III a percentagem de amostras satisfatórias e aceitáveis é de 42,3% e 53,8%, respetivamente, quer isto dizer que 96,2% das amostras encontram-se dentro dos limites estabelecidos para este parâmetro microbiológico. À semelhança do Grupo I, as amostras não satisfatórias dizem respeito a t0. Contudo, em t1, há também que referir a diminuição das amostras satisfatórias e um aumento das amostras aceitáveis. Quer isto dizer que apesar de não se verificar amostras não satisfatórias, as contagens em t1 foram superiores, o que levou à diminuição das amostras tidas como satisfatórias. Estes resultados indicam que há uma maior contaminação em t1. A contaminação das saladas pode justificar-se pelo facto de serem servidas pelo próprio consumidor, promovendo assim a contaminação se o consumidor não seguir as boas práticas de higiene.

Correia, C. *et al.* (2014), nas análises realizadas em alimentos prontos a consumir, realizam a pesquisa de Enterobacteriaceae a 37 °C e os resultados obtidos para contagem de *Enterobacteriaceae* foram avaliados tendo por base os critérios estabelecidos nos "Valores Guia, INSA" para o parâmetro coliformes. Obtiveram uma percentagem de amostras satisfatórias/aceitáveis de 91,5% e 68,8% para o Grupo I e III, respectivamente.

Legnami *et al.* (2003), apenas apresenta resultados referentes ao parâmetro de coliformes para os alimentos do Grupo I, sendo a percentagem de satisfatórios/aceitáveis de 93,4%.
Comparando os valores com os dois estudos referidos, verifica-se que os resultados do presente estudo são superiores, o que nos remete para umas condições de preparação, confeção e serviço de refeições de qualidade em comparação com outros estabelecimentos.

Da pesquisa de *E.coli* resultaram 3 amostras contaminadas com a bactéria, relativas ao Grupo III (ver Anexo F), 2 delas apresentam resultados satisfatórios (uma relativa a t0 e uma relativa a t1), uma vez que apresentam menos de 10 ufc/g de alimento, enquanto que uma amostra, alface (A48), recolhida em t1, apresenta um resultado não satisfatório dado que apresenta 1×10^2 ufc/g de alimento. Os resultados para E. *coli* encontram-se dentro dos limites aceitáveis em 100% e 96,2 % dos alimentos do Grupo I e Grupo III, respetivamente.

Os resultados de Correia *et al.* (2014) indicam que os alimentos do Grupo I e Grupo III apresentam qualidade satisfatória/aceitável na ordem dos 98,6%.
No estudo efetuado por Legnami et al. (2003) as amostras analisadas indicam para os Grupo I e III, uma percentagem de 94,6% e 93% respetivamente.

Ferreira, J. (2011), para o Grupo I registou uma percentagem de 100% de amostras satisfatórias em ambos os tempos, e para o Grupo III, as amostras apresentaram uma percentagem de 95% e 100% para t0 e t2, respetivamente.

Nos estudos analisados, à semelhança do presente estudo, os resultados para a pesquisa de *E. coli* rondam valores próximos do 100%. Uma percentagem elevada de amostras satisfatórias para o parâmetro *E.coli* significa que o processamento térmico aplicado aos alimentos é eficaz.

Contagem de *Staphylococcus* com coagulase positiva

Tabela 22 - Classificação das amostras relativas ao parâmetro *Staphylococcus* com coagulase positiva.

			Classificação de acordo com os "Valores Guia INSA"		
Microrganismos	**Grupo**	**Tempo**	**Satisfatório**	**Aceitável**	**Não-satisfatório**
Staphylococcus aureus	Grupo I	t0	26	0	0,0%
			100%	0,0%	0,0%
		t1	26	0	0,0%
			100%	0,0%	0,0%
		total	**100%**	**0,0%**	**0,0%**
	Grupo III	t0	13	0	0,0%
			100%	0,0%	0,0%
		t1	13	0	0,0%
			100%	0,0%	0,0%
		total	**100%**	**0,0%**	**0,0%**

Como referido anteriormente não se registou crescimento de colónias do patogénico *S. aureus* em qualquer amostra analisada. Desta forma, a nível deste parâmetro, 100% das amostras revelam resultados satisfatórios (Tabela 22).

Os resultados obtidos por Correia, C. et al., relativamente à pesquisa de *S. aureus* indicam amostras satisfatórias/aceitáveis de 99,1% para alimentos do Grupo I e III.

Em relação aos resultados obtidos por Legnami *et al.* (2003), os alimentos do Grupo I apresentam uma percentagem de satisfatórios/aceitáveis de 96,7%.

A ausência da *S. aureus* em todas as amostras recolhidas remete-nos para o cumprimento das boas práticas de higiene, relativamente ao bom comportamento dos manipuladores, bem como dos próprios consumidores durante o serviço das saladas.

Nesta fase procurámos avaliar cada amostra recolhida tendo em conta os parâmetros microbiológicos avaliados e os valores-guia do INSA.

Para que uma amostra seja considerada satisfatória na globalidade, terá que ser satisfatória em todos os parâmetros avaliados.

Tabela 23 - Classificação das amostras por Grupo e tempos de recolha.

		Classificação de acordo com os "Valores Guia INSA"			
Recolha das amostras	**Grupo de Alimentos prontos a consumir**	**Satisfatório**	**Aceitável**	**Não Satisfatório**	**Inaceitável Potencialmente Perigoso**
t0	Grupo I	19	4	3	0
	Grupo III	0	11	2	0
t1	Grupo I	19	5	2	0
	Grupo III	0	10	3	0
	TOTAL	38	30	10	0
	(%)	48,7%	38,5%	12,8%	0,0%

O total das 78 amostras analisadas, encontravam-se dentro dos limites consideráveis satisfatórios e aceitáveis, 48,7% e 38,5%, respectivamente. Desta forma, um total de 87,2% das amostras recolhidas apresenta condições aceitáveis para serem consumidas.

Apresentaram resultados não satisfatórios 10 das amostras analisadas, 12,8%. A ausência de *S. aureus* (agente patogénico pesquisado) contribuiu para a percentagem nula de amostras com presença de microrganismos potenciais causadores de toxinfeção alimentar, ou seja, nenhuma amostra apresentou contagem de microrganismos considerada inaceitável/potencialmente patogênico (Tabela 23).

O número de amostras satisfatórias, aceitáveis e não satisfatórias é semelhante em t0 e t1. Estes resultados sugerem como indício de que não há diferenças microbiológicas significativas durante o tempo de serviço de refeições.

Após a análise dos resultados por tempos de recolha, analisamos agora por Grupo de Alimentos tabela 24.

Tabela 24 - Classificação das amostras por Grupo de alimento.

	Classificação de acordo com os "Valores Guia INSA"			
	Satisfatório	**Aceitável**	**Não Satisfatório**	**Inaceitável Potencilamente Perigoso**
Grupo I	73,1%	17,3%	9,6%	0,0%
Grupo III	0,0%	80,8%	19,2%	0,0%

Analisando os resultados obtidos por grupo, tabela 24, verificamos que o Grupo I apresenta uma percentagem de amostras satisfatórias e aceitáveis de 73,08% e 17,30%, respetivamente, e uma percentagem de amostras não satisfatórias de 9,62%. No que concerne ao grupo III, a percentagem de valores satisfatórios é nula, sendo a percentagem de amostras aceitáveis na ordem dos 80,7%. Neste grupo aumenta também a percentagem de amostras não satisfatórios para 19,23%.

Ao comparar as classificações obtidas entre o Grupo I e Grupo III, o Grupo I apresenta uma percentagem mais elevada de amostras dentro dos limites aceitáveis em relação do Grupo III, o que seria de esperar, uma vez que os alimentos pertencentes ao Grupo I sofrem tratamento térmico que permite eliminar a maioria dos microrganismos, enquanto que os alimentos do Grupo III são sujeitos a uma solução desinfetante de cloro, sendo posteriormente lavada e manipulada.

Tabela 25 - Resultados obtidos no Estudo de análise de dados microbiológicos de géneros alimentícios prontos a comer servidos no ano 2013 em unidade de restauração, Correia, C. *et al.,* 2015)

	Classificação de acordo com os "Valores Guia INSA"			
	Satisfatório	**Aceitável**	**Não Satisfatório**	**Inaceitável Potencilamente Perigoso**
Grupo I	54,8%	27,1%	17,7%	0,4%
Grupo III	8,5%	42,0%	49,0%	0,5%

Comparando os resultados com os resultados no estudo acima referido, relativamente ao Grupo I, os números são superiores no que diz respeito a amostras satisfatórias e mais baixos para a amostras não satisfatórias e inaceitável potencialmente perigoso. O mesmo acontece no Grupo III. Apesar de não apresentarmos valores satisfatórios, a nossa percentagem de amostras aceitáveis ronda os 80%, contribuindo assim para uma percentagem de não satisfatória na ordem dos 20%, enquanto que o estudo do INSA, apresenta uma percentagem de não satisfatórios de 49%.

As amostras consideradas Não Satisfatórias devem a sua classificação à existência de pelo menos um parâmetro superior aos limites estabelecidos. Neste estudo encontraram-se, respetivamente, 10 amostras (Tabela 26) classificadas desta forma por esses motivos.

Tabela 26 - Amostras analisadas que apresentam valor superior ao aceitável e o parâmetro responsável.

	Parâmetros analisados			
Grupo de Alimentos prontos a consumir	**Mesófilos**	**Bolores**	**Coliformes**	**E. Coli**
Grupo I	3	0	2	0
Grupo III	0	3	1	1
TOTAL	3	3	3	1

Os alimentos do Grupo I e Grupo III apresentam um número idêntico de amostras não satisfatórias. Os parâmetros analisados que indicam contagens com valores superiores aos aceitáveis para o Grupo I são, microrganismos a 30°C e coliformes totais, e para o Grupo III são os bolores, coliformes totais e *E. coli* (Tabela 26). Em todos os casos, apenas um parâmetro contribuiu para a classificação das amostras em Não-satisfatórias, não se observando, para nenhuma amostra, mais do que um parâmetro não satisfatório.

Os resultados obtidos por Correia, C. *et al.* (2015) indicam que, para o Grupo I, os parâmetros que mais contribuem resultados superiores aos aceitáveis são a contagem de microrganismos a 30°C e contagem de coliformes, à semelhança do presente estudo. Para o Grupo III, a contagem de *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C e bolores são os parâmetros que mais contribuem. No nosso estudo, o parâmetro que mais contribui é a contagem de bolores, seguida da contagem de coliformes e *E. coli.*

Qualquer avaliação não satisfatória indica ineficiência do sistema HACCP, devendo ser implementadas as ações necessárias que conduzam ao controlo da situação. Só o cumprimento escrupuloso da metodologia preventiva subjacente ao HACCP, permite garantir a qualidade do produto final e salvaguardar os próprios operadores. Ao nível da restauração coletiva nem sempre é fácil colocar em prática estes métodos, devido à variabilidade e quantidade de pratos preparados.

No entanto, é ainda de salientar, que os resultados encontrados revelam que os operadores envolvidos na preparação dos alimentos analisados, demonstraram preocupação em cumprir os requisitos de boas práticas de confeção e manipulação dos alimentos, que são fundamentais para assegurar e promover a qualidade e segurança dos alimentos.

11. Conclusão

Como conclusão final deste trabalho, perante elevada percentagem de amostras satisfatórias/aceitáveis, podemos dizer que as amostras analisadas não apresentaram um risco para a saúde pública. Apesar da reduzida percentagem de alimentos que ultrapassaram os limites estipulados como aceitáveis, os resultados não devem ser negligenciados.

O presente estudo tinha também como objetivo verificar se as refeições servidas, ao longo do período de serviço de refeições, apresentavam a mesma qualidade a nível microbiológico. Com este estudo permitiu-se concluir, não existem diferenças significativas entre as refeições servidas em t0 e t1, para todos os parâmetros avaliados. Desta forma, e tendo em linha de conta que as refeições são preparadas com a devida antecedência ao início da abertura da cantina, devido às quantidades confeccionadas, podemos concluir, que as refeições/alimentos são conservadas respeitando todas as condições gerais descritas no plano de HACCP, no que diz respeito à temperatura bem como às condições de higiene.

Os resultados encontrados revelam que, os operadores envolvidos na preparação dos produtos em análise, demonstraram preocupação em cumprir as boas práticas de confeção e manipulação dos alimentos, que são fundamentais para assegurar e promover a qualidade e segurança dos mesmos. Contudo é importante reforçar a importância das boas práticas do cumprimento das boas práticas de higiene fabrico, de forma a colmatar a contaminação microbiológica.

12. Bibliografia

- A3 Análises, Águas e Alimentos, Lda. – Manual de boas práticas, 2008.
- AFONSO, A. – Metodologia HACCP – Prevenção de acidentes alimentares. Segurança e qualidade alimentar. (2006) pp.12-15.
- ARAÚJO, M. Segurança Alimentar – Os perigos para a saúde através dos alimentos. Lisboa: Meriberica/Liber, 1997.
- ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica – Perigos biológicos. Lisboa, (2015). [Consultado em: 15 de Agosto de 2015]. Disponível em: http://www.asae.pt/
- BAPTISTA, P. e ANTUNES, C. Higiene e Segurança Alimentar na Restauração – Vol.II. 1ª ed. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, Guimarães, 2005.
- BAPTISTA, P. e LINHARES, M. Higiene e Segurança Alimentar na Restauração – Vol.I. 1ª ed. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, Guimarães, 2005.
- CAC - Código de práticas internacionais recomendadas – Princípios gerais de higiene alimentar, CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. [Consultado em: 16 de Julho de 2015]. Disponível em: http://www.esac.pt/noronha/manuais/manuais.htm
- CALHAU, M. - Toxinfeções alimentares, um problema de saúde pública. Boletim de Epidemiológico Observações. 2ª série, n°7. (2014). [Consultado em: 21 de Julho de 2015]. Disponível em: http://repositorio.insa.pt/retrieve/6687/Boletim_Epidemiologico_Observacoes_7_2014.pdf
- CAPONIGRO, V., VENTURA, M., CHIANCONE, I. *et al.* Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer. Food Microbiology, 27, (2010) pp. 1071-1077.
- CARDOSO, T. CARVALHO. Toxinfecção alimentar por Salmonella spp. Revista instituto ciências da saúde (2006); 24(2)95-101.
- CHRISTISON, C., LINDSAY, D., *et al.* A. Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. Food Control, 19, (2007) pp. 727-733.
- CORREIA, C., BONITO, C., BARREIRA, M., *et al.* Análise de dados microbiológicos de géneros alimentícios prontos a comer servidos no ano de 2013 em unidades de restauração coletiva. Boletim de Epidemiológico Observações. 2ª série, n°4 (2015). [Consultado em: 21 de Julho de 2015]. Disponível em: http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/3010/3/observacoesNEspecia5-2015_artigo4.pdf
- CORREIA, C., CAMPOS, I.C., COELHO, A.S., *et al.* - Investigação laboratorial de toxinfeções alimentares (2008-2011). Boletim Epidemiológico Observações. 2ª série, n°6 (2013). [Consultado em: 21 de Julho de 2015]. Disponível em:

http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/PublicacoesRepositorio/Documents/observacoesN6 2013_artigo1.pdf

- Decreto-Lei nº 243/2001 de 31 de 5 de setembro. Diário da República nº 206– Série I – A. Ministério dos Negócios Estrangueiros. Lisboa.
- Decreto-Lei nº 67/98 de 31 de Dezembro. Diário da República nº 65 – Série I – A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Decreto-Lei nº 67/98, de 18 de março de 1998. Diário da República n.º 65/1998– I Série-A, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Lisboa.
- EFSA - The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Jounal (2013); 11(4):3129 [Consultado em: 8 de Agosto de 2015]. Disponível em: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3991
- EFSA - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA Journal (2015); 13(1):3991 [Consultado em: 8 de Agosto de 2015]. Disponível em: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3129
- FANG, T., WEI, Q., LIAO, C., *et al.*- Microbiological quality of 18ºC ready-to-eat food products sold in Taiwan. International Journal of Food Microbiology, 80, (2003), pp. 241-250.
- FERNANDES, E., Silva, M.F.L., Ramalhosa, E. (2012) Sistemas de Gestão da Segurança Alimentar: Guia para a sua implementação em unidades de restauração. 1ª Ed. Edições Silabo, Lda., Lisboa, Portugal, 212 p.
- FERREIRA, J. Segurança alimentar na restauração de eventos: Avaliação microbiológica de preparações culinárias em diferentes tempos de exposição. Instituto Superior Egas Moniz: 2011.
- FIPA (2004). Jornadas da Alimentação – Higiene Segurança, Qualidade e Inovação. Boletim informativo da Federação das Industrias Portuguesas Agro- Alimentares. [Consultado em: 18 de Agosto de 2015]. Disponível em: http://www.fipa.pt/fipaflash55.pdf
- FORSYTHE, S. J. The Microbiology of safe food. Nova Iorque, EUA: WILEY-BLACKWELL, 2010.
- FURTADO, R., COELHO, A., CORREIA, C., *et al*. Enterotoxinas estafilocócicas em géneros alimentícios. Boletim Epidemioógico Observações. 2ª Séria, nº 13 (2014). [Consultado em: 21 de Julho de 2015]. Disponível em: http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/2298/3/observacoesNEspecial3-2014_artigo13.pdf
- ISO 16649-2. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of β-glucuronidase-positive Escherichia coli – Part 2: Colony-count Technique

at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-Dglucuronide. International Organization for Standardization, (2001). Geneve, Suiça: International Organization for Standardization.

- ISO 4832. Microbiology of food and animal feefing stuffs – Horizontal method for enumeration of coliforms – Colony-Count technique. (2001). Genève, Suiça: International Organization for Standardization.
- ISO 6888-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Suffs – Horizontal Method for the Enumeration of of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Part 1: Technique using Baird Parker agar. (1999). Genève, Suiça: International Organization for Standardization.
- JAY, J.M., Loessner, M.J. e Golden, D.A. Modern Food Micobiology, (7th ed.). Nova Iorque, EUA: Springer, 2005.
- LACASSE, D. Introdução à Microbiologia Alimentar. Lisboa: Ciência e Técnica – Instituto Piaget, 1995.
- LEGNAMI, P., LEONI, E., BERVEGLIERI, M., et al. Hygienic controlo of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipament. Food Control, (2004) 15, 205-211. Disponível em: http://smas.chemeng.ntua.gr/miram/files/publ_194_10_2_2005.pdf
- NOVAIS, M. Boas Práticas e Pré-Requisitos HACCP. Revista Segurança e Qualidade Alimentar, n°1. Novembro 2006.
- NP 1828 – Microbiologia Alimentar – Colheita de amostras para análise microbiológica. IPQ, Lisboa (1982).
- NP 1829 – Microbiologia Alimentar – Preparação da amostra para análise microbiológica. IPQ, Lisboa. (1982).
- NP 4405 – Microbiologia alimentar: Regras gerais para a contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30°C. Instituto Português da Qualidade. (1982).
- NUNES, E.; BREDA, J. Manual para uma alimentação saudável em jardins de infância. DGS, Divisão de Promoção e Educação para a Saúde. Lisboa: 2001.
- PINTO, J. e NEVES, R. HACCP – Análise de Riscos no Processamento Alimentar. 2ªEdição. Porto, 2010.
- Regulamento (CE) N.° 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. 1-23.
- Regulamento (CE) n.° 852/2004, de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, Jornal Oficial da União Europeia L 139/1, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Regulamento (CE) n.° 853/2004, de 29 de abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, Jornal Oficial da União Europeia, L139/55, Comissão Europeia, Bruxelas.

- RISER, E. C.; GRARABOWSKI, J.; GLENN, E.P. Microbiology of hydroponically-grown lettuce. Journal of food protection, v47, n.10, (1984) p.756-769.
- SANTOS, M.I. Estimativa da flora microbiana e eventuais patogénicos em saladas minimamente processadas prontas para consumo. Lisboa: Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2009. Dissertação de Mestrado.
- SANTOS, M.I., CORREA, C., CUNHA, *et al,*. Valores Guia para Avaliação da Qualidade Microbiológica de Alimentos Prontos a Comer Preparados em Estabelecimentos de Restauração. Revista da Ordem dos Farmacêuticos, (2005), 64, 66-68.
- SORIANO, J. M., FONT, G., MOLTO, J. C. *et al.* – Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. Trends in Food Science and Technology, (2002). 13 (2), 60-67.
- VIEGAS, S., CUNHA, I., CORREIA, C., *et al.* – Investigação laboratorial de surtos de toxinfeções alimentares, 2014. Boletim Epidemiológico Observações. 2ª Série, nº1 (2015). [Consultado em: 21 de Julho de 2015]. Disponível em: http://repositorio.insa.pt/retrieve/6687/Boletim_Epidemiologico_Observacoes_7_2014.pdf

13. Anexos

Anexo A – Contagem de microrganismos a 30°C

CONTAGEM ALIMENTOS t0				CONTAGEM ALIMENTOS t1			
Código	Alimentos	UFC/g	Qualidade Microbiológica	Código	Alimentos	UFC/g	Qualidade Microbiológica
A 1	Lombo c/ batata frita	0,00E+00	S	A 2	Lombo c/ batata frita	1,18E+04	NS
A 7	Rancho	0,00E+00	S	A 8	Rancho	0,00E+00	S
A 13	Tortilha	0,00E+00	S	A 14	Tortilha	0,00E+00	S
A 19	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 20	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 25	Rancho	0,00E+00	S	A 26	Rancho	0,00E+00	S
A 31	Hamburgeres	9,09E+00	S	A 32	Hamburgeres	9,09E+00	S
A 37	Tortilha	0,00E+00	S	A 38	Tortilha	0,00E+00	S
A 43	Almondegas c/ esparguete	2,34E+03	A	A 44	Almondegas c/ esparguete	6,82E+02	A
A 49	Feijoada	0,00E+00	S	A 50	Feijoada	3,64E+01	S
A 55	Almondegas c/ esparguete	3,55E+02	A	A 56	Almondegas c/ esparguete	2,73E+01	S
A 61	Rambone c/ batata assada	1,09E+02	A	A 62	Rambone c/ batata assada	1,27E+02	A
A 67	Rancho	1,75E+03	A	A 68	Rancho	0,00E+00	S
A 73	Frango assado c/ arroz	9,09E+00	S	A 74	Frango assado c/ arroz	0,00E+00	S
A 3	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S	A4	Filetes c/ arroz branco	1,27E+04	NS
A 9	Solha c/ puré	0,00E+00	S	A 10	Solha c/ puré	0,00E+00	S
A 15	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 16	Carapau assado c/ batata cozida	1,82E+01	S
A 21	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	S	A 22	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	S
A 27	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 28	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 33	Massada de peixe	1,27E+02	A	A 34	Massada de peixe	2,00E+03	A
A 39	Filetes c/ arroz branco	5,82E+03	A	A 40	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 45	Solha c/ arroz branco	8,00E+04	NS	A 46	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 51	Lulas c/ batata cozida	9,09E+00	S	A 52	Lulas c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 57	Pataniscas c/ arroz de feijão	2,82E+03	A	A 58	Pataniscas c/ arroz de feijão	9,09E+00	S
A 63	Massada de lulas	2,09E+03	A	A 64	Massada de lulas	4,36E+02	A
A 69	Solha c/ arroz branco	1,18E+02	S	A 70	Solha c/ arroz branco	3,45E+02	A
A 75	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 76	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 5	Alface	3,64E+02	S	A 6	Alface	6,45E+03	S
A 11	Alface c/ cenoura	1,66E+03	S	A 12	Alface c/ cenoura	3,45E+03	S
A 17	Alface c/ tomate	3,91E+02	S	A 18	Alface c/ tomate	9,09E+02	S
A 23	Alface c/ tomate	4,09E+02	S	A 24	Alface c/ tomate	7,91E+02	S
A 29	Alface	9,73E+02	S	A 30	Alface	1,00E+02	S
A 35	Alface	2,82E+02	S	A 36	Alface	1,00E+02	S
A 41	Alface	0,00E+00	S	A 42	Alface	5,45E+02	S
A 47	Alface	4,18E+03	S	A 48	Alface	2,26E+03	S
A 53	Alface	3,73E+03	S	A 54	Alface	2,91E+03	S
A 59	Alface	2,90E+05	A	A 60	Alface	3,27E+03	S
A 65	Alface	6,64E+04	A	A 66	Alface	4,45E+04	A
A 71	Alface	2,80E+03	S	A 72	Alface	9,09E+03	S
A 77	Alface	6,36E+03	S	A 78	Alface	2,07E+04	A

Legenda:
S - Satisfatório
A -Aceitável
Ns- Não satisfatório

Anexo B – Contagem de Bolores

CONTAGEM ALIMENTOS GRUPO I				CONTAGEM ALIMENTOS GRUPO III			
Código	**Alimentos**	**UFC/g**	**Qualidade Microbiológica**	**Código**	**Alimentos**	**UFC/g**	**Qualidade Microbiológica**
A 1	Lombo c/ batata frita	0	S	A 2	Lombo c/ batata frita	0	S
A 7	Rancho	0	S	A 8	Rancho	0	S
A 13	Tortilha	0	S	A 14	Tortilha	0	S
A 19	Strogonofe c/ arroz branco	0	S	A 20	Strogonofe c/ arroz branco	0	S
A 25	Rancho	0	S	A 26	Rancho	0	S
A 31	Hamburgeres	0	S	A 32	Hamburgeres	0	S
A 37	Tortilha	0	S	A 38	Tortilha	0	S
A 43	Almondegas c/ esparguete	0	S	A 44	Almondegas c/ esparguete	0	S
A 49	Feijoada	0	S	A 50	Feijoada	0	S
A 55	Almondegas c/ esparguete	0	S	A 56	Almondegas c/ esparguete	0	S
A 61	Rambone c/ batata assada	0	S	A 62	Rambone c/ batata assada	0	S
A 67	Rancho	0	S	A 68	Rancho	0	S
A 73	Frango assado c/ arroz	0	S	A 74	Frango assado c/ arroz	0	S
A 3	Filetes c/ arroz branco	0	S	A4	Filetes c/ arroz branco	0	S
A 9	Solha c/ puré	0	S	A 10	Solha c/ puré	0	S
A 15	Carapau assado c/ batata cozida	0	S	A 16	Carapau assado c/ batata cozida	0	S
A 21	Pescada no forno c/ batata assada	0	S	A 22	Pescada no forno c/ batata assada	0	S
A 27	Abrotia c/ arroz branco	0	S	A 28	Abrotia c/ arroz branco	0	S
A 33	Massada de peixe	0	S	A 34	Massada de peixe	0	S
A 39	Filetes c/ arroz branco	0	S	A 40	Filetes c/ arroz branco	0	S
A 45	Solha c/ arroz branco	0	S	A 46	Solha c/ arroz branco	0	S
A 51	Lulas c/ batata cozida	0	S	A 52	Lulas c/ batata cozida	0	S
A 57	Pataniscas c/ arroz de feijão	0	S	A 58	Pataniscas c/ arroz de feijão	0	S
A 63	Massada de lulas	0	S	A 64	Massada de lulas	0	S
A 69	Solha c/ arroz branco	0	S	A 70	Solha c/ arroz branco	0	S
A 75	Carapau assado c/ batata cozida	0	S	A 76	Carapau assado c/ batata cozida	0	S
A 5	Alface	7,18E+02	A	A 6	Alface	5,64E+02	A
A 11	Alface c/ cenoura	1,31E+03	NS	A 12	Alface c/ cenoura	1,54E+03	NS
A 17	Alface c/ tomate	5,64E+02	A	A 18	Alface c/ tomate	1,09E+03	NS
A 23	Alface c/ tomate	6,91E+02	A	A 24	Alface c/ tomate	8,18E+01	S
A 29	Alface	1,45E+02	A	A 30	Alface	4,18E+02	A
A 35	Alface	7,27E+01	S	A 36	Alface	3,91E+02	A
A 41	Alface	9,45E+02	A	A 42	Alface	1,09E+02	A
A 47	Alface	6,36E+01	S	A 48	Alface	1,09E+02	A
A 53	Alface	2,27E+02	A	A 54	Alface	1,91E+02	A
A 59	Alface	5,45E+02	A	A 60	Alface	9,09E+01	S
A 65	Alface	1,91E+02	A	A 66	Alface	3,55E+02	A
A 71	Alface	5,45E+01	S	A 72	Alface	4,55E+01	S
A 77	Alface	9,09E+00	S	A 78	Alface	9,09E+00	S

Legenda:

S - Satisfatório

A -Aceitável

Ns- Não satisfatório

Anexo C – Contagem de Leveduras

CONTAGEM ALIMENTOS GRUPO I				CONTAGEM ALIMENTOS GRUPO III			
Código	Alimentos	UFC/g	Qualidade Microbiológica	Código	Alimentos	UFC/g	Qualidade Microbiológica
A 1	Lombo c/ batata frita	0,00E+00	S	A 2	Lombo c/ batata frita	0,00E+00	S
A 7	Rancho	0,00E+00	S	A 8	Rancho	0,00E+00	S
A 13	Tortilha	0,00E+00	S	A 14	Tortilha	0,00E+00	S
A 19	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 20	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 25	Rancho	0,00E+00	S	A 26	Rancho	0,00E+00	S
A 31	Hamburgeres	0,00E+00	S	A 32	Hamburgeres	0,00E+00	S
A 37	Tortilha	0,00E+00	S	A 38	Tortilha	0,00E+00	S
A 43	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S	A 44	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S
A 49	Feijoada	0,00E+00	S	A 50	Feijoada	0,00E+00	S
A 55	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S	A 56	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S
A 61	Rambone c/ batata assada	0,00E+00	S	A 62	Rambone c/ batata assada	0,00E+00	S
A 67	Rancho	9,09E+00	S	A 68	Rancho	0,00E+00	S
A 73	Frango assado c/ arroz	0,00E+00	S	A 74	Frango assado c/ arroz	0,00E+00	S
A 3	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S	A4	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 9	Solha c/ puré	0,00E+00	S	A 10	Solha c/ puré	0,00E+00	S
A 15	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 16	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 21	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	S	A 22	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	S
A 27	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 28	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 33	Massada de peixe	0,00E+00	S	A 34	Massada de peixe	0,00E+00	S
A 39	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 40	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 45	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 46	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 51	Lulas c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 52	Lulas c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 57	Pataniscas c/ arroz de feijão	0,00E+00	S	A 58	Pataniscas c/ arroz de feijão	0,00E+00	S
A 63	Massada de lulas	2,09E+02	A	A 64	Massada de lulas	1,09E+02	A
A 69	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 70	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 75	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 76	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 5	Alface	2,24E+04	A	A 6	Alface	4,47E+04	A
A 11	Alface c/ cenoura	4,47E+04	A	A 12	Alface c/ cenoura	1,06E+04	A
A 17	Alface c/ tomate	7,85E+03	A	A 18	Alface c/ tomate	2,76E+03	A
A 23	Alface c/ tomate	2,25E+03	A	A 24	Alface c/ tomate	5,18E+03	A
A 29	Alface	4,27E+02	A	A 30	Alface	3,01E+03	A
A 35	Alface	1,96E+04	A	A 36	Alface	1,04E+04	A
A 41	Alface	1,35E+04	A	A 42	Alface	1,13E+04	A
A 47	Alface	7,07E+03	A	A 48	Alface	1,50E+04	A
A 53	Alface	9,36E+03	A	A 54	Alface	2,34E+03	A
A 59	Alface	5,16E+03	A	A 60	Alface	4,57E+03	A
A 65	Alface	2,11E+04	A	A 66	Alface	2,84E+03	A
A 71	Alface	1,00E+03	A	A 72	Alface	6,32E+03	A
A 77	Alface	4,45E+03	A	A 78	Alface	1,05E+04	A

Legenda:

S - Satisfatório

A -Aceitável

Ns- Não satisfatório

Anexo D – Contagem de Coliformes totais

CONTAGEM ALIMENTOS t0				CONTAGEM ALIMENTOS t1			
Código	Alimentos	UFC/g	Qualidade Microbiológica	Código	Alimentos	UFC/g	Qualidade Microbiológica
A 1	Lombo c/ batata frita	0,00E+00	S	A 2	Lombo c/ batata frita	1,82E+01	A
A 7	Rancho	0,00E+00	S	A 8	Rancho	0,00E+00	S
A 13	Tortilha	0,00E+00	S	A 14	Tortilha	0,00E+00	S
A 19	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 20	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 25	Rancho	0,00E+00	S	A 26	Rancho	0,00E+00	S
A 31	Hamburgeres	0,00E+00	S	A 32	Hamburgeres	0,00E+00	S
A 37	Tortilha	0,00E+00	S	A 38	Tortilha	0,00E+00	S
A 43	Almondegas c/ esparguete	1,35E+03	NS	A 44	Almondegas c/ esparguete	9,09E+00	S
A 49	Feijoada	0,00E+00	S	A 50	Feijoada	0,00E+00	S
A 55	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S	A 56	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S
A 61	Rambone c/ batata assada	0,00E+00	S	A 62	Rambone c/ batata assada	0,00E+00	S
A 67	Rancho	0,00E+00	S	A 68	Rancho	0,00E+00	S
A 73	Frango assado c/ arroz	0,00E+00	S	A 74	Frango assado c/ arroz	0,00E+00	S
A 3	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S	A4	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 9	Solha c/ puré	0,00E+00	S	A 10	Solha c/ puré	0,00E+00	S
A 15	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 16	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 21	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	S	A 22	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	S
A 27	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 28	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 33	Massada de peixe	0,00E+00	S	A 34	Massada de peixe	4,55E+01	A
A 39	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 40	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 45	Solha c/ arroz branco	4,55E+01	A	A 46	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 51	Lulas c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 52	Lulas c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 57	Pataniscas c/ arroz de feijão	0,00E+00	s	A 58	Pataniscas c/ arroz de feijão	0,00E+00	s
A 63	Massada de lulas	3,09E+02	NS	A 64	Massada de lulas	0,00E+00	s
A 69	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	s	A 70	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	s
A 75	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	s	A 76	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	s
A 5	Alface	1,82E+01	S	A 6	Alface	3,00E+02	A
A 11	Alface c/ cenoura	2,95E+03	A	A 12	Alface c/ cenoura	1,59E+03	A
A 17	Alface c/ tomate	1,55E+02	A	A 18	Alface c/ tomate	1,73E+02	A
A 23	Alface c/ tomate	0,00E+00	S	A 24	Alface c/ tomate	0,00E+00	S
A 29	Alface	0,00E+00	S	A 30	Alface	0,00E+00	S
A 35	Alface	0,00E+00	S	A 36	Alface	0,00E+00	S
A 41	Alface	0,00E+00	S	A 42	Alface	7,36E+02	A
A 47	Alface	8,18E+01	S	A 48	Alface	1,82E+02	A
A 53	Alface	1,82E+01	S	A 54	Alface	7,27E+01	S
A 59	Alface	1,20E+04	NS	A 60	Alface	7,18E+02	A
A 65	Alface	1,08E+03	A	A 66	Alface	2,73E+01	A
A 71	Alface	4,36E+02	A	A 72	Alface	6,55E+03	A
A 77	Alface	1,95E+03	A	A 78	Alface	6,73E+02	A

Legenda:

S - Satisfatório

A -Aceitável

Ns- Não satisfatório

Anexo E – Contagem de Coliformes fecais

CONTAGEM ALIMENTOS t0				CONTAGEM ALIMENTOS t1			
Código	**Alimentos**	**UFC/g**	**Qualidade Microbiológica**	**Código**	**Alimentos**	**UFC/g**	**Qualidade Microbiológica**
A 1	Lombo c/ batata frita	0,00E+00	-	A 2	Lombo c/ batata frita	2,73E+01	-
A 7	Rancho	0,00E+00	-	A 8	Rancho	0,00E+00	-
A 13	Tortilha	0,00E+00	-	A 14	Tortilha	0,00E+00	-
A 19	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	-	A 20	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	-
A 25	Rancho	0,00E+00	-	A 26	Rancho	0,00E+00	-
A 31	Hamburgeres	0,00E+00	-	A 32	Hamburgeres	0,00E+00	-
A 37	Tortilha	0,00E+00	-	A 38	Tortilha	0,00E+00	-
A 43	Almondegas c/ esparguete	1,08E+03	-	A 44	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	-
A 49	Feijoada	0,00E+00	-	A 50	Feijoada	0,00E+00	-
A 55	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	-	A 56	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	-
A 61	Rambone c/ batata assada	0,00E+00	-	A 62	Rambone c/ batata assada	0,00E+00	-
A 67	Rancho	0,00E+00	-	A 68	Rancho	0,00E+00	-
A 73	Frango assado c/ arroz	0,00E+00	-	A 74	Frango assado c/ arroz	0,00E+00	-
A 3	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	-	A4	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	-
A 9	Solha c/ puré	0,00E+00	-	A 10	Solha c/ puré	0,00E+00	-
A 15	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	-	A 16	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	-
A 21	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	-	A 22	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	-
A 27	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	-	A 28	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	-
A 33	Massada de peixe	0,00E+00	-	A 34	Massada de peixe	0,00E+00	-
A 39	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	-	A 40	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	-
A 45	Solha c/ arroz branco	6,36E+01	-	A 46	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	-
A 51	Lulas c/ batata cozida	0,00E+00	-	A 52	Lulas c/ batata cozida	0,00E+00	-
A 57	Pataniscas c/ arroz de feijão	0,00E+00	-	A 58	Pataniscas c/ arroz de feijão	0,00E+00	-
A 63	Massada de lulas	1,09E+02	-	A 64	Massada de lulas	0,00E+00	-
A 69	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	-	A 70	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	-
A 75	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	-	A 76	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	-
A 5	Alface	0,00E+00	-	A 6	Alface	1,82E+01	-
A 11	Alface c/ cenoura	7,55E+02	-	A 12	Alface c/ cenoura	1,55E+02	-
A 17	Alface c/ tomate	9,09E+00	-	A 18	Alface c/ tomate	1,82E+01	-
A 23	Alface c/ tomate	0,00E+00	-	A 24	Alface c/ tomate	0,00E+00	-
A 29	Alface	0,00E+00	-	A 30	Alface	0,00E+00	-
A 35	Alface	0,00E+00	-	A 36	Alface	0,00E+00	-
A 41	Alface	0,00E+00	-	A 42	Alface	5,45E+01	-
A 47	Alface	0,00E+00	-	A 48	Alface	0,00E+00	-
A 53	Alface	1,18E+02	-	A 54	Alface	7,27E+01	-
A 59	Alface	2,64E+02	-	A 60	Alface	0,00E+00	-
A 65	Alface	2,27E+02	-	A 66	Alface	1,09E+02	-
A 71	Alface	0,00E+00	-	A 72	Alface	1,82E+01	-
A 77	Alface	0,00E+00	-	A 78	Alface	0,00E+00	-

Legenda:
S - Satisfatório
A -Aceitável
Ns- Não satisfatório

Anexo F – Contagem de Escherichia coli

CONTAGEM ALIMENTOS t0				CONTAGEM ALIMENTOS t1			
Código	**Alimentos**	**UFC/g**	**Qualidade Microbiológica**	**Código**	**Alimentos**	**UFC/g**	**Qualidade Microbiológica**
A 1	Lombo c/ batata frita	0,00E+00	S	A 2	Lombo c/ batata frita	0,00E+00	S
A 7	Rancho	0,00E+00	S	A 8	Rancho	0,00E+00	S
A 13	Tortilha	0,00E+00	S	A 14	Tortilha	0,00E+00	S
A 19	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 20	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 25	Rancho	0,00E+00	S	A 26	Rancho	0,00E+00	S
A 31	Hamburgeres	0,00E+00	S	A 32	Hamburgeres	0,00E+00	S
A 37	Tortilha	0,00E+00	S	A 38	Tortilha	0,00E+00	S
A 43	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S	A 44	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S
A 49	Feijoada	0,00E+00	S	A 50	Feijoada	0,00E+00	S
A 55	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S	A 56	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S
A 61	Rambone c/ batata assada	0,00E+00	S	A 62	Rambone c/ batata assada	0,00E+00	S
A 67	Rancho	0,00E+00	S	A 68	Rancho	0,00E+00	S
A 73	Frango assado c/ arroz	0,00E+00	S	A 74	Frango assado c/ arroz	0,00E+00	S
A 3	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S	A4	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 9	Solha c/ puré	0,00E+00	S	A 10	Solha c/ puré	0,00E+00	S
A 15	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 16	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 21	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	S	A 22	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	S
A 27	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 28	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 33	Massada de peixe	0,00E+00	S	A 34	Massada de peixe	0,00E+00	S
A 39	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 40	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 45	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 46	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 51	Lulas c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 52	Lulas c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 57	Pataniscas c/ arroz de feijão	0,00E+00	S	A 58	Pataniscas c/ arroz de feijão	0,00E+00	S
A 63	Massada de lulas	0,00E+00	S	A 64	Massada de lulas	0,00E+00	S
A 69	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 70	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 75	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 76	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 5	Alface	0,00E+00	S	A 6	Alface	9,09E+00	S
A 11	Alface c/ cenoura	9,09E+00	S	A 12	Alface c/ cenoura	0,00E+00	S
A 17	Alface c/ tomate	0,00E+00	S	A 18	Alface c/ tomate	0,00E+00	S
A 23	Alface c/ tomate	0,00E+00	S	A 24	Alface c/ tomate	0,00E+00	S
A 29	Alface	0,00E+00	S	A 30	Alface	0,00E+00	S
A 35	Alface	0,00E+00	S	A 36	Alface	0,00E+00	S
A 41	Alface	0,00E+00	S	A 42	Alface	0,00E+00	S
A 47	Alface	0,00E+00	S	A 48	Alface	1,00E+02	NS
A 53	Alface	0,00E+00	S	A 54	Alface	0,00E+00	S
A 59	Alface	0,00E+00	S	A 60	Alface	0,00E+00	S
A 65	Alface	0,00E+00	S	A 66	Alface	0,00E+00	S
A 71	Alface	0,00E+00	S	A 72	Alface	0,00E+00	S
A 77	Alface	0,00E+00	S	A 78	Alface	0,00E+00	S

Legenda:

S - Satisfatório

A -Aceitável

Ns- Não satisfatório

Anexo G – Contagem de Staphylococcus com coagulase positiva

CONTAGEM ALIMENTOS t0				CONTAGEM ALIMENTOS t1			
Código	**Alimentos**	**UFC/g**	**Qualidade Microbiológica**	**Código**	**Alimentos**	**UFC/g**	**Qualidade Microbiológica**
A 1	Lombo c/ batata frita	0,00E+00	S	A 2	Lombo c/ batata frita	0,00E+00	S
A 7	Rancho	0,00E+00	S	A 8	Rancho	0,00E+00	S
A 13	Tortilha	0,00E+00	S	A 14	Tortilha	0,00E+00	S
A 19	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 20	Strogonofe c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 25	Rancho	0,00E+00	S	A 26	Rancho	0,00E+00	S
A 31	Hamburgeres	0,00E+00	S	A 32	Hamburgeres	0,00E+00	S
A 37	Tortilha	0,00E+00	S	A 38	Tortilha	0,00E+00	S
A 43	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S	A 44	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S
A 49	Feijoada	0,00E+00	S	A 50	Feijoada	0,00E+00	S
A 55	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S	A 56	Almondegas c/ esparguete	0,00E+00	S
A 61	Rambone c/ batata assada	0,00E+00	S	A 62	Rambone c/ batata assada	0,00E+00	S
A 67	Rancho	0,00E+00	S	A 68	Rancho	0,00E+00	S
A 73	Frango assado c/ arroz	0,00E+00	S	A 74	Frango assado c/ arroz	0,00E+00	S
A 3	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S	A4	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 9	Solha c/ puré	0,00E+00	S	A 10	Solha c/ puré	0,00E+00	S
A 15	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 16	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 21	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	S	A 22	Pescada no forno c/ batata assada	0,00E+00	S
A 27	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 28	Abrotia c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 33	Massada de peixe	0,00E+00	S	A 34	Massada de peixe	0,00E+00	S
A 39	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 40	Filetes c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 45	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 46	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 51	Lulas c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 52	Lulas c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 57	Pataniscas c/ arroz de feijão	0,00E+00	S	A 58	Pataniscas c/ arroz de feijão	0,00E+00	S
A 63	Massada de lulas	0,00E+00	S	A 64	Massada de lulas	0,00E+00	S
A 69	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S	A 70	Solha c/ arroz branco	0,00E+00	S
A 75	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S	A 76	Carapau assado c/ batata cozida	0,00E+00	S
A 5	Alface	0,00E+00	S	A 6	Alface	0,00E+00	S
A 11	Alface c/ cenoura	0,00E+00	S	A 12	Alface c/ cenoura	0,00E+00	S
A 17	Alface c/ tomate	0,00E+00	S	A 18	Alface c/ tomate	0,00E+00	S
A 23	Alface c/ tomate	0,00E+00	S	A 24	Alface c/ tomate	0,00E+00	S
A 29	Alface	0,00E+00	S	A 30	Alface	0,00E+00	S
A 35	Alface	0,00E+00	S	A 36	Alface	0,00E+00	S
A 41	Alface	0,00E+00	S	A 42	Alface	0,00E+00	S
A 47	Alface	0,00E+00	S	A 48	Alface	0,00E+00	S
A 53	Alface	0,00E+00	S	A 54	Alface	0,00E+00	S
A 59	Alface	0,00E+00	S	A 60	Alface	0,00E+00	S
A 65	Alface	0,00E+00	S	A 66	Alface	0,00E+00	S
A 71	Alface	0,00E+00	S	A 72	Alface	0,00E+00	S
A 77	Alface	0,00E+00	S	A 78	Alface	0,00E+00	S

Legenda:

S - Satisfatório

A -Aceitável

Ns- Não satisfatório