

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE GÉNEROS ALIMENTÍCIOS EM ESTABELECIMENTOS DE RESTAURAÇÃO

Caracterização de Alimentos e Identificação de Factores de Risco

Andreia Marques Monteiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Zootécnica – Produção Animal

Orientador: Professora Doutora Teresa de Jesus da Silva Matos

Co-orientador: Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo Pina Nunes

Júri:

Presidente: Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Yolanda Maria Vaz, Professora Associada da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Teresa de Jesus Silva Matos, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo Pina Nunes, Investigador da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Ao apresentar este trabalho quero agradecer a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a sua realização:

À Dra Ana Amaro, Directora do laboratório do Centro de Formação Profissional de Segurança Alimentar por ter aceite o meu estágio, disponibilizando a documentação necessária relativa à actividade da instituição.

À Dra. Teresa Matos, Professora do Instituto Superior de Agronomia, por ter aceite orientar a minha tese de mestrado.

Ao Médico Veterinário Telmo Nunes por ter aceite co-orientar o meu trabalho, pela disponibilidade e bom acolhimento que demonstrou em me receber, pelo apoio na análise dos resultados, pelos esclarecimentos prestados e, por todas as facilidades concedidas.

Ao Médico Veterinário André Magalhães pela disponibilidade em me receber bem como no acompanhamento técnico da sua área de trabalho, interesse demonstrado na realização deste trabalho, pelas facilidades concedidas, disponibilização de documentação, pelo apoio e incentivo e, pela ajuda na revisão do texto e discussão dos resultados.

À Diana e à Andreia pela simpatia, constante motivação e disponibilidade, amizade inigualável demonstradas durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmão pela presença constante, compreensão e apoio incondicional ao longo do curso, tornando possível a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O âmbito deste estudo visou a caracterização microbiológica de alimentos, análise sazonal, identificação de factores de risco e formas de controlo.

Considerando 1981 boletins analíticos (1174, 298 e 509 dos grupos G1, G2 e G3, respectivamente) do Centro de Formação Profissional de Segurança Alimentar relativos a 2006, criou-se uma base de dados em sistema informático *Microsoft Office Access 2003*. Os resultados foram analisados em programa informático SAS e método do Qui-quadrado baseando-se nos Valores Guia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Verificou-se uma reduzida proporção de alimentos não satisfatórios e inaceitáveis. Tal deveu-se aos coliformes totais (21,10%) dos quais a *Escherichia coli* representou 3,94% (principalmente do G1), à flora mesófila (12,57%) (frequentemente no G1), a bolores e leveduras (3,63% e 3,33%, respectivamente) e a *Staphylococcus* coagulase-positiva (1,26%). Os inaceitáveis verificaram-se para *Staphylococcus* coagulase-positiva e *Salmonella* em carne assada e Frango à Brás, respectivamente; *Listeria monocytogenes* (2,25%) ocorreu em 12, 7 e 6 alimentos de G1, G2 e G3, respectivamente.

A maior proporção de alimentos com mesófilos totais, bolores, leveduras, coliformes totais e *Escherichia coli* ocorreu no segundo e terceiro trimestres.

Concluindo, a maioria dos alimentos foram satisfatórios e aceitáveis representando os inaceitáveis um risco para a saúde pública de gravidade considerável.

Palavras-chave: pratos cozinhados, caracterização microbiológica, indicadores, factores de risco.

ABSTRACT

The scope of this study was the microbiological characterization of foods, seasonal analysis, identification of risk factors and control measures.

Based on 1981 analytical surveys (1174, 298 and 509 of the groups G1, G2 and G3, respectively) of the *Centro de Formação Profissional de Segurança Alimentar* ⁽¹⁾ for 2006, was performed a database in the Microsoft Office Access 2003 software. The results were analyzed using the SAS software and Qui-square method and based on the Guide Values of *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge* ⁽²⁾.

There was a small proportion of unsatisfactory and unacceptable foods. These are due to total coliforms (21.10%) of which *Escherichia coli* was 3.94% (mainly G1), mesophilic flora (12.57%) (G1 more common), molds and yeasts (3.63% and 3.33% respectively) and *Staphylococcus* coagulase-positive (1.26%). The unacceptable were found to coagulase-positive *Staphylococcus* and *Salmonella* in roast beef and “*Frango à Brás*”, respectively; *Listeria monocytogenes* (2.25%) occurred in 12, 7 and 6 food of G1, G2 and G3, respectively.

The largest proportion of food with mesophiles, molds, yeasts, total coliforms and *Escherichia coli* occurred in the second and third quarters of the year.

In conclusion, the majority of foods was satisfactory and acceptable and unacceptable represents a serious risk for public health.

Keywords: ready-to-eat foods, microbiological characterization, indicators, risk factors.

⁽¹⁾ Center of Professional Formation of Food Safety

⁽²⁾ National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge

EXTENDED ABSTRACT

Microflora of food products is greatly influenced by the production process and by intrinsic and extrinsic characteristics of the products. Contamination of foods can be of endogenous or of exogenous origin. The first due to the commensal flora or pathogens presents in the raw material and, the second takes place at different stages of the food processing through contact with soil, water, waste water, environment, cross-contamination, inadequate heat treatment, inadequate storage, handlers, surfaces, animal feed, insects and pests.

In order to reduce or eliminate contamination of food it is necessary the application of control measures to assure the food safety and the warranty of the public health. This objective can be achieved using physical factors such as temperature, irradiation or the acidification but mainly by the application of appropriate hygiene practices at all stages of the food production.

Relevant microorganisms studied in this work were the foodborne pathogens. They present different characteristics in growth and survival conditions, toxins production, pathogenicity and symptoms of disease. Predominant species are: *Staphylococcus* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp. and *Yersinia* spp. These types of microorganisms are responsible for three types of foodborne diseases: intoxication - the microbial toxins are pre-formed in food; infection - ingestion of microorganisms, and toxi-nfection - ingestion of pathogens in high quantity, proliferation and production of toxins in the digestive tract of the individual.

The scope of this study was the microbiological analysis of 1981 analytical surveys for samples of ready-to-eat foods served at a restaurant in 2006, seasonal analysis, identification of risk factors and identification of control measures. With this purpose was performed a database in the Microsoft Office Access software with the information of the microbiological parameters analyzed at the “*Centro de Formação Profissional de Segurança Alimentar*” (CFPSA). For the classification of the level of microbiological quality were considered the Guide Values of the National Health Institute Dr. Ricardo Jorge (INSA). These guide values are organized in three categories, G1 (Meals/sandwiches/cakes/desserts with fully cooked ingredients, or added with spices, dried herbs, dehydrated or treated with ionizing radiation, UHT products and industrialized mayonnaise), G2 (cooked meals/sandwiches/cakes/desserts added of raw ingredients and/or with own specific flora) and G3 (raw salads/vegetable/fruit. Data were entered on the following microbiological parameters, for 1174, 298 and 509 foods belonging to the groups G1, G2 and G3,

respectively: mesophiles (ufc/g), molds (ufc/g), yeasts (ufc/g), total coliformes (ufc/g), *Escherichia coli* (ufc/g), coagulase-positive *Staphylococcus* (ufc/g), *Salmonella* (25g) e *Listeria monocytogenes* (25g). For statistical analysis was used the SAS software (SAS Institute, version 9.1, Cary, NC) and, for the comparison between levels of microbiological quality, was used the chi-square method, for a significance level of 0, 05. The results showed that most foods, regardless of group, and for all analyzed parameters showed satisfactory and acceptable levels of microbiological quality with a small proportion of unsatisfactory and unacceptable. The foods most frequently characterized as unsatisfactory were due to the numbers of total coliforms (21,10%) (mainly for the G1 (9,34%) and G3 (8,18%) groups), and mesophiles (12,57%) (with the majority being of G1 (9,49%) group); moulds and yeasts counts showed similar proportions and G3 was the food group for which the occurrence of molds was more frequent while for yeasts there was no food of the G3 group with counts at this level of quality, being the foods of G2 group the most common (2,22%); the foods with *Escherichia coli* (3,94%) were mostly belonging to the G1 group (2,52%); those with *Staphylococcus* coagulase-positive had lower proportions (1,26%). Foods classified as unacceptable were found: in a sample of roast beef with coagulase-positive *Staphylococcus*, a sample of “*Frango à Brás*” with *Salmonella* and 2.25% of the samples with *Listeria monocytogenes* (12, 7 e 6 of the G1, G2 e G3 groups, respectively).

The seasonal analysis showed that foods with mesophilic, molds, yeasts and total coliforms mainly occurred in the second and third quarters of the year. The differences were significant for the G1 and G3, G1 and G2, G2 and G3 groups of foods, respectively. This difference may be associated with higher temperatures at this time of year

In conclusion, it can be said that most foods, regardless of the group to which they belong, were satisfactory and acceptable and, despite the low proportion of unacceptable, these are a risk for the public health.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE QUADROS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MICROFLORA DOS ALIMENTOS.....	1
1.1.1. Alimentos Crus.....	3
1.1.2. Alimentos Cozinhados	7
1.2. MICRORGANISMOS CAUSADORES DE DOENÇA DE ORIGEM ALIMENTAR.....	8
1.2.1. <i>Staphylococcus</i> spp.	9
1.2.2. <i>Clostridium perfringens</i>	11
1.2.3. <i>Clostridium botulinum</i>	13
1.2.4. <i>Bacillus cereus</i>	14
1.2.5. <i>Listeria monocytogenes</i>	16
1.2.6. <i>Salmonella</i> spp.....	17
1.2.7. <i>Shigella</i> spp.....	20
1.2.8. <i>Escherichia coli</i>	21
1.2.9. <i>Campylobacter</i> spp.	25
1.2.10. <i>Vibrio</i> spp.	27
1.2.11. <i>Yersinia</i> spp.	29
1.3. CAUSAS DA CONTAMINAÇÃO E FACTORES QUE INFLUENCIAM A MULTIPLICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS NOS ALIMENTOS	30
1.3.1. Matérias-primas.	32
1.3.2. Manipuladores.....	33
1.3.3. Equipamentos e Utensílios.	33
1.3.4. Solo, Água e Ar	34
1.3.5. Águas Residuais.	35
1.3.6. Pragas.....	36
1.4. CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS	36
1.4.1. Indicadores e Índices Microbiológicos.	37
1.4.2.1. Bactérias aeróbias mesófilas totais.....	38
1.4.2.2. Coliformes totais	38
1.4.2.3. Coliformes fecais.....	39

1.4.2.4. <i>Salmonella</i> spp.....	39
1.4.2.5. <i>Staphylococcus</i> spp.	39
1.4.2.6. <i>Listeria monocytogenes</i>	40
1.4.2.7. Bolores e Leveduras	40
1.5. MECANISMOS DE SEGURANÇA ALIMENTAR EM RESTAURAÇÃO.....	40
1.5.1. Legislação	40
1.5.2. Boas Práticas de Higiene.....	41
1.5.3. Autocontrolo	43
1.5.2. Controlos oficiais.....	43
2. MATERIAIS E MÉTODOS	44
2.1. PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS.....	44
2.1.1. Tipo de Amostragem.....	44
2.1.2. Constituição da Base de Dados.....	46
2.2. ANÁLISE DOS DADOS.....	46
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
3. RESULTADOS	49
3.1. ANÁLISE MICROBIOLÓGICAS DOS ALIMENTOS.....	49
3.2. DISTRIBUIÇÃO SAZONAL	57
4. DISCUSSÃO	63
4.1. METODOLOGIA ADOPTADA	63
4.2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	64
4.2.1. Contagem de Microrganismos Aeróbios Mesófilos Totais	64
4.2.2. Contagem de Bolores e Leveduras.....	65
4.2.3. Contagem de Coliformes Totais.....	66
4.2.4. Contagem de <i>Escherichia coli</i>	67
4.2.5. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva.....	68
4.2.6. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	69
4.2.7. Pesquisa e Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	70
5. CONCLUSÕES	72
BIBLIOGRAFIA	
ANEXO 1	
ANEXO 2	
ANEXO 3	
ANEXO 4	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema resumo da origem das contaminações dos alimentos	31
Figura 2. Prevalência de microrganismos aeróbios mesófilos totais, bolores, leveduras, coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> nos alimentos de acordo com a categoria	54
Figura 3. Prevalência de <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva nos alimentos de acordo com a categoria	55
Figura 4. Distribuição sazonal dos alimentos G1, G2 e G3 para os quais foram detectados microrganismos aeróbios mesófilos totais de acordo com o nível de qualidade microbiológica	58
Figura 5. Distribuição sazonal dos alimentos G1, G2 e G3 para os quais foram detectados bolores de acordo com o nível de qualidade microbiológica	59
Figura 6. Distribuição sazonal dos alimentos G1, G2 e G3 para os quais foram detectados leveduras de acordo com o nível de qualidade microbiológica....	60
Figura 7. Distribuição sazonal dos alimentos G1, G2 e G3 para os quais foram detectados coliformes totais de acordo com o nível de qualidade microbiológica.....	62

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Géneros de bactérias frequentemente detectados nos alimentos	3
Quadro 2. Género de bolores e leveduras frequentemente detectados nos alimentos .	3
Quadro 3. Resumo dos sinais e sintomas das doenças provocadas por <i>E. coli</i>	25
Quadro 4. Grupos de alimentos prontos a consumir	45
Quadro 5. Valores Guia da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a consumir	47
Quadro 6. Níveis de qualidade microbiológica para produtos prontos a consumir	48
Quadro 7. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando são detectados microrganismos aeróbios mesófilos totais.....	49
Quadro 8. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando são detectados bolores	50
Quadro 9. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando são detectadas leveduras	50
Quadro 10. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando são detectadas coliformes totais.....	51
Quadro 11. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando é detectada <i>Escherichia coli</i>	51
Quadro 12. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando é detectada <i>Staphylococcus coagulase-positiva</i>	52
Quadro 13. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando é detectada <i>Salmonella</i> spp.	52
Quadro 14. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando é detectada <i>Listeria monocytogenes</i>	53
Quadro 15. Frequências absolutas dos alimentos não satisfatórios e inaceitáveis presentes na amostra de acordo com o microrganismo analisado	55

Quadro 16. Frequências dos alimentos de G1, G2 e G3 por trimestre (T1, T2, T3 e T4) de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando são detectados microrganismos aeróbios mesófilos totais	57
Quadro 17. Frequências dos alimentos de G1, G2 e G3 por trimestre (T1, T2, T3 e T4) de acordo com o nível de qualidade microbiológica quando são detectados bolores	58
Quadro 18. Frequências dos alimentos de G1, G2 e G3 por trimestre (T1, T2, T3 e T4) de acordo com o nível de qualidade microbiológica quando são detectadas leveduras	59
Quadro 19. Frequências dos alimentos de G1, G2 e G3 por trimestre (T1, T2, T3 e T4) de acordo com o nível de qualidade microbiológica quando são detectados coliformes totais.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E	Lesão " <i>attaching and effacing</i> "
ARESP	Associação da Restauração e Similares de Portugal
ASP	<i>Amnesic Shellfish Poisoning</i>
a_w	Actividade da água
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CE	Comissão Europeia
CFA	<i>colonization factor antigens</i>
CFPSA	Centro de Formação Profissional de Segurança Alimentar
D	Tempo de redução decimal
DSP	<i>Diarrhoetic Shellfish Poisoning</i>
EEB	Encefalopatia Espongiforme Bovina
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogénica
EPS	Exopolissacarídica
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigénica
G1	Grupo de alimentos prontos a consumir
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i>
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IPAC	Instituto Português de Acreditação
LT	Enterotoxinas termolábeis
NHE	Enterotoxina não-hemolítica
NS	Não satisfatório
PSP	<i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>
S	Satisfatório
S+A	Satisfatório + Aceitável
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SHU	Síndrome Hemolítico Urémico
SLT I	Toxinas semelhantes a Shiga 1
SLT II	Toxinas semelhantes a Shiga 2
ST	Enterotoxinas termoestáveis
T	Trimestre
UE	União Europeia
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
VTEC	<i>E. coli</i> produtoras de verotoxina
VT1	Verotoxina 1
VT2	Verotoxina 2
WHO	<i>World Health Organization</i>

Introdução

1. Introdução

Os alimentos representam ecossistemas heterogéneos e as suas características físico-químicas influenciam o crescimento e sobrevivência dos microrganismos e, conseqüentemente, o seu tempo de vida útil. Estes podem conter microrganismos degradantes, responsáveis por alterações que por vezes são indesejáveis, ou patogénicos, que afectam a salubridade dos alimentos (podem causar toxinfecções). Do ponto de vista da saúde pública, a sua presença nos alimentos resulta de uma contaminação microbiológica, ou seja, a presença de qualquer microrganismo estranho à sua natureza e composição, a qual pode ocorrer em qualquer fase do processamento alimentar. As fontes de contaminação são: o solo, o ar, a água e águas residuais, as matérias-primas, os manipuladores, os equipamentos, os utensílios, os insectos e as pragas. Neste sentido, é necessário aplicar medidas de controlo a fim de eliminar ou reduzir para níveis aceitáveis o número de microrganismos.

Para o efeito do presente trabalho foi criada uma base de dados a partir dos boletins analíticos produzidos pelo laboratório de microbiologia alimentar do Centro de Formação Profissional de Segurança Alimentar (CFPSA). Os dados foram analisados com base nos Valores Guia propostos pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Estes são critérios microbiológicos que constituem linhas de orientação para a avaliação da qualidade microbiológica dos produtos. Os objectivos foram os seguintes: caracterização microbiológica de alimentos, análise da distribuição sazonal, identificação de factores de risco e identificação de formas de controlo.

1.1 Microflora dos Alimentos

Os alimentos possuem características intrínsecas (pH, potencial de oxidação-redução, actividade da água (a_w), nutrientes, e estruturas biológicas) e extrínsecas (a temperatura, a humidade relativa, presença e concentração de gases (CO_2 , O_2 e N_2), presença e actividade de outros microrganismos) (Jay *et al.*, 2005; Vierling e Leyral, 2007), que interactuam e influenciam o crescimento e sobrevivência microbiana, ou seja, actuam como factores de selecção. Os microrganismos nos alimentos são classificados em patogénicos ou de degradação e, quando adaptados, podem crescer e desenvolver-se produzindo efeitos desejáveis de importância tecnológica (fermentações, probióticos e simbióticos), ou indesejáveis, como são exemplo aqueles que influenciam a qualidade alimentar e os que afectam a segurança dos alimentos (Jay *et al.*, 2005; Vierling e Leyral, 2007). Os microrganismos patogénicos são aqueles que, quando presentes nos alimentos causam, directa ou indirectamente, danos aos indivíduos que os consomem, isto é, doenças de origem alimentar. Estas doenças são definidas pela *World Health Organization* (WHO)

Introdução

como sendo “de natureza infecciosa ou tóxica causadas, ou possivelmente causadas, pelo consumo de alimentos ou água”.

Os microrganismos responsáveis pela contaminação dos alimentos podem ser de origem endógena ou exógena (Joffin e Joffin, 2003; Vierling e Leyral, 2007). A contaminação endógena diz respeito aos microrganismos presentes na matéria-prima ou no alimento, previamente à sua manipulação e transformação. No caso dos alimentos de origem animal pode referir-se a contaminação com os microrganismos que constituem a flora normal presente na pele, vias respiratórias e tracto gastrointestinal [por exemplo, microrganismos de origem fecal como bactérias anaeróbias (*Clostridium*, *Bacteroides*), aero-anaeróbias (enterobactérias) e microaerofilas (enterococos, *Campylobacter*)]. Pode igualmente justificar-se pelo facto do alimento ser proveniente de animais doentes e, neste caso, é possível a presença de microrganismos como *Brucella* spp., bacilos tuberculosos, *Francisella tularensis*, *Pasteurella* spp. e o prião da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) (Vierling e Leyral, 2007). A contaminação exógena deve-se à introdução dos microrganismos através da manipulação das matérias-primas ou dos alimentos, desde a produção primária às unidades de armazenamento e transformação (Jay *et al.*, 2005; Vierling e Leyral, 2007) e, a flora final colonizadora pode ser sensivelmente diferente da flora original. Na produção primária, os frutos, os vegetais e os animais, podem ser contaminados em consequência das actividades agrícolas enquanto, nas unidades industriais, a contaminação deve-se ao contacto com superfícies, equipamentos e utensílios, matérias-primas, alimentos e manipuladores (Jay *et al.*, 2005).

Neste capítulo é efectuada uma abordagem à microflora dos alimentos cozinhados e crus, isto é, caso sejam ou não submetidos a tratamento a térmico, respectivamente. Nos quadros 1 e 2 constam os géneros de bactérias, bolores e leveduras frequentemente detectados nos alimentos.

Introdução

Quadro 1. Géneros de bactérias frequentemente detectados nos alimentos

Bactérias				
<i>Acinetobacter</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Pandoraea</i>	<i>Shigella</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Aphingomonas</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Pedicoccus</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Arcobacter</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Proteus</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Vagococcus</i>
<i>Brevibacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Listeria</i>	<i>Psychrobacter</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Brochothrix</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Weissella</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Shewanella</i>	

Quadro 2. Género de bolores e leveduras frequentemente detectados nos alimentos.

Bolores		Leveduras	
<i>Alternaria</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Brettanomyces/Dekkera</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Monilia</i>	<i>Cândida</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
<i>Botrytis</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Torulaspora</i>
<i>Byssochlamys</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Trichothecium</i>	<i>Issatchenkia</i>	<i>Yarrowia</i>
<i>Colletotrichum</i>	<i>Wallemia</i>	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Xeromyces</i>	<i>Pichia</i>	

Adaptado de Jay *et al.*, 2007

1.1.1 Alimentos crus

Os alimentos crus são aqueles, cujos ingredientes, não são submetidos a tratamento térmico e, neste grupo, estão incluídos alimentos tais como as carnes vermelhas, carne de aves e seus derivados; peixe e marisco; laticínios; ovos; frutos e vegetais; cereais e leguminosas. Estes alimentos raramente são estéreis, possuindo uma microflora própria representativa de todo o processo produtivo (Jay *et al.*, 2005; Vierling e Leyral, 2007), a qual deve ser tão reduzida quanto possível. Para este efeito procede-se ao armazenamento das matérias-primas e produtos acabados a temperaturas de refrigeração, o que é tanto mais importante quanto maior a sua perecibilidade.

As carnes vermelhas e de aves pela sua origem, natureza e composição (ricos em nutrientes, pH próximo da neutralidade e elevada humidade) são excelentes meios para a proliferação de grande quantidade de microrganismos, sendo influenciada pela temperatura e pelo oxigénio disponível. A temperaturas compreendidas entre 25 °C e 40 °C, o desenvolvimento da flora de superfície é limitado e as bactérias anaeróbias proliferam mais

Introdução

rapidamente. Em consequência do abaixamento do potencial de oxidação-redução, inicialmente proliferam as bactérias microaerófilas (enterococos) seguindo-se o *Clostridium perfringens* (do género *Clostridium* é a espécie mais tolerante ao oxigénio) que produz substâncias redutoras em quantidades adequadas ao estabelecimento das espécies *Cl. sporogenes*, *Cl. bifermentans* e *Cl. histolyticum* (Vierling e Leyral, 2007). Entre 15 °C e 25 °C, à superfície, estão presentes *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Lactobacillus* e, em profundidade, as enterobactérias e as bactérias anaeróbias. Em carnes refrigeradas a degradação é mais lenta e deve-se à flora de superfície aeróbia e psicrófila: *Sporotrichum canis*, *Penicillium* e *Cladosporium herbarum* (quando a superfície apresenta reduzido teor de humidade); e, diversas espécies de *Pseudomonas*, e em menor grau, *Flavobacterium*, *Micrococcus* e *Leuconostoc* (carne cuja superfície se apresenta húmida). A estas temperaturas também estão presentes bactérias fermentativas, não proteolíticas, microaerófilas ou aeroanaeróbias fermentativas como *Lactobacillus*, estreptococos, *Leuconostoc* e enterobactérias (Vierling e Leyral, 2007). De um modo geral, na carne, são predominantes as bactérias Gram-negativas e, dentro das Gram-positivas, *Enterococcus* e *Lactobacillus* são as mais frequentes (Tabela 1, Anexo 1). Os fungos detectados são: *Penicillium*, *Mucor* e *Cladosporium* (Tabela 2, Anexo 1) e as leveduras pertencem aos géneros *Cândida* e *Rhodotorula* (Jay et al., 2005) (Tabela 3, Anexo 1). Samelis et al. (2001) referem que estes alimentos podem estar contaminados por *Salmonella* spp. (*S. enteritidis*), *C. jejuni* e *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *T. gondii*, *E. coli* O157:H7, *Vibrio* e *Shigella* spp. e, segundo a WHO (2005) pode ser detectada *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC). As carnes de frango, peru, pato, codorniz e avestruz são os principais reservatórios de *Campylobacter* spp. (Kiseon et al., 2007) e de *Salmonella* spp. (Oliveira et al., 2002; James et al. 2007). Oliveira et al. (2002) referem que as bactérias do género *Salmonella* mais frequentes nestes produtos são as espécies *S. enteritidis* e *S. typhimurium*. As carcaças de aves domésticas podem apresentar-se contaminadas por patogénicos de origem entérica, *Campylobacter* spp. (maioritariamente *C. jejuni* e *C. coli*) (WHO, 2000) e *Enterobacteriaceae* como *E. coli*, coliformes ou *Salmonella* (WHO, 2005), *S. aureus* e *L. monocytogenes*. (Kiseon et al., 2007).

A flora microbiana do peixe e marisco é representada por espécies halófilas, psicrófilas e psicrotróficas. São sobretudo espécies Gram-negativas pertencentes aos géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter* e *Moraxella*. Nos peixes pode ser isolado *Cl. perfringens* e *Salmonella* spp. O marisco pode conter *Salmonella* spp., *C. jejuni*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *T. gondii*, *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7, *Vibrio* spp. e *Shigella* spp. É possível que antes da captura possa ocorrer contaminação por agentes de envenenamento alimentar como “diarrhoetic shellfish poisoning” ⁽¹⁾ (DSP), “paralytic shellfish poisoning” ⁽²⁾ (PSP), “amnesic shellfish poisoning” ⁽³⁾ (ASP) e “ciguatera

Introdução

toxin"⁽⁴⁾ (altamente estáveis à cozedura) (McLauchlin e Little, 2007). Os moluscos acumulam bactérias e vírus presentes na água sendo possível detectar-se *Salmonella* spp. e vírus Norwalk (ostras) (Kirby *et al.*, 2003). Nos crustáceos, além das espécies anteriores, estão presentes micrococcos e corinebactérias (Vierling e Leyral, 2007). A microflora destes produtos é influenciada pelo local onde estão presentes: em zonas costeiras a contaminação pode dever-se a norovírus, ao vírus da hepatite, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e outros *Vibrio* spp., *Cryptosporidium* e *Giardia*. Quando produzidos em viveiros contactam com desperdícios humanos ou animais havendo possibilidade de contaminação por organismos patogénicos (Jay *et al.*, 2005). Vierling e Leyral (2007) referem que ao quinto dia de conservação a 3,5 °C a microflora é, maioritariamente, constituída por bactérias do género *Pseudomonas*, em particular por *Pseudomonas putrefaciens*.

O leite, na glândula mamária de animais saudáveis, é estéril, contudo, posteriormente à ordenha, ocorre contaminação por *Lactobacillus* e estreptococos lácticos (glândulas mamárias), enterobactérias, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, micrococcos, corinebactérias, *Bacillus*, *Streptococcus faecalis* (ambiente) (Vierling e Leyral, 2007); *Clostridium* spp., enterobactérias, coliformes, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp. (bactérias de origem fecal), *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, *Brucella*, *Bacillus anthracis*, *Listeria* e diversos vírus (animais doentes) (Vierling e Leyral, 2007). O leite cru e seus derivados podem estar contaminados por *S. enteritidis*, EHEC (frequentemente, *E. coli* O157:H7) (WHO, 2005), *L. monocytogenes*, *Cl. perfringens*, *Campylobacter* spp. (McLauchlin e Little, 2007).

Os iogurtes são produzidos pela actividade de *Lactobacillus bulgaricus* e de *Streptococcus thermophilus* e, a sua actividade antimicrobiana inibe o desenvolvimento da maioria dos microrganismos. A presença de espécies indesejadas responsáveis pela alteração do aspecto e do sabor pode ocorrer. A contaminação por microrganismos patogénicos como *E. coli* O157: H7 e *Salmonella* spp. é rara (Vierling e Leyral, 2007).

⁽¹⁾ Toxina Diarreica do Marisco

⁽²⁾ Toxina Paralítica do Marisco

⁽³⁾ Toxina Amnésica do Marisco

⁽⁴⁾ Toxina de Ciguatera

Introdução

O queijo é um produto derivado do leite e a sua microflora é representativa da flora original sendo constituída por bactérias lácticas – estreptococos lácticos (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremosis* e *Streptococcus diacetylactis*), lactobacilos (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus thermophilus*) e por *Leuconostoc*, ou bactérias superficiais (contaminantes), e bactérias propiónicas. Os bolores pertencem ao género *Penicillium* e as espécies de leveduras são numerosas e derivadas do leite (Vierling e Leyral, 2007). A avaliação da qualidade microbiológica de 1819 amostras de queijos de pasta mole ou semi-dura, efectuada por Little *et al.* (2008), revelou que 2% eram insatisfatórias pela presença de elevados níveis de *S. aureus* (13 amostras com números variáveis entre $1,6 \times 10^5$ e $>10^7$ ufc/g), *E. coli* (25 amostras com valores compreendidos entre $1,1 \times 10^5$ e $4,6 \times 10^6$ ufc/g), e *L. monocytogenes* presente em números superiores a 10^2 ufc/g (1 amostra contendo 220 ufc/g), não tendo sido detectada *Salmonella* spp. A contaminação total de *Listeria* spp. (incluindo *L. monocytogenes*) em queijos foi de 3,1%; *L. innocua* estava presente numa amostra em $8,3 \times 10^3$ ufc/g; *L. monocytogenes* foi detectada em 1% das amostras.

Relativamente aos ovos pode referir-se que o seu interior, na maioria dos casos, é estéril. Contudo, devido ao seu percurso descendente pelo intestino, a casca pode ser contaminada por *Salmonella* spp., especialmente por *S. enteritidis* (contaminação fecal) (McLauchlin e Little, 2007), *E. coli*, *Vibrio* spp. e *S. aureus*. Consequentemente, pode ocorrer a entrada de microrganismos para o interior do ovo através da porosidade da casca. O uso de ovos contaminados na confecção de ovoprodutos origina a sua contaminação.

A flora original dos frutos e legumes consiste, quase exclusivamente, em bactérias presentes no ambiente. Os patogénicos, caso sejam detectados, são provenientes das actividades agrícolas, devido à fertilização com estrumes (*E. coli* O157, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp. e *Cryptosporidium*) e devido ao sistema de rega [*E. coli*, entre as quais *E. coli* O157: H7 (WHO, 2005), *Cryptosporidium*, *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*) (WHO, 2000; Godoy *et al.*, 2002), *Shigella*, *Y. enterocolitica* e vírus Norwalk) e da manipulação dos produtos (Vierling e Leyral, 2007)]. Após a colheita estão presentes bactérias e fungos: as alterações bacterianas (não se verificam nos frutos devido à sua elevada acidez) devem-se a *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter*. As alterações fúngicas, em frutos e vegetais, são devidas a *Botrytis cinereae*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Phytophthora*, *Trichothecium*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Trichodrema* e *Aspergillus* (Vierling e Leyral, 2007). Ainda, nos vegetais podem ser detectados *Cl. perfringens*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. (WHO, 2005), *E. coli* Verocitotóxica (VTEC) (McLauchlin e Little, 2007) e *Bacillus cereus* (Valero *et al.*, 2002). Nos frutos frescos pode ocorrer *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 (WHO, 2005).

Introdução

As especiarias actuam como importantes veículos de vários microrganismos, especialmente, formadores de esporos. São capazes de suportar o crescimento e desenvolvimento de patogénicos bacterianos e a produção de enterotoxinas (Banerjee e Sakar, 2004) mas não de modo activo devido ao seu reduzido teor de humidade. Contudo, se estes ingredientes forem incluídos em alimentos cujo teor de humidade é elevado, como molhos ou carne, os esporos germinam rapidamente contaminando os produtos finais. Num estudo sobre a qualidade microbiológica de 27 tipos de especiarias em 20 estados da Índia, Banerjee e Sakar (2003) concluíram que 51% e 97% das amostras estavam contaminados com bactérias aeróbias mesófilas (a níveis inaceitáveis) e bolores, respectivamente. Verificaram que apenas uma das amostras continha leveduras. *B. cereus*, *Cl. perfringens*, *S. aureus*, enterobactérias, coliformes e coliformes fecais ocorreram em 85%, 59%, 11% e 85%, 33%, 15% das amostras, respectivamente. *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. foram detectadas apenas em 2,6% das amostras e *E. coli* estava presente em apenas uma amostra de alho. Dos ingredientes analisados o pimentão preto em pó, a alcaravia, o alho e a malagueta vermelha não continham *B. cereus*. Mas este patogénico foi detectado em todas as amostras de “ajmud”, “cardamom” e cominho em pó.

1.1.2 Alimentos cozinhados

Os alimentos cozinhados são aqueles cujas matérias-primas foram submetidas a elevadas temperaturas durante a confecção, permitindo a eliminação ou redução da carga microbiana a níveis aceitáveis. Este tratamento consiste na combinação dos parâmetros tempo e temperatura, contudo, não garante a total esterilidade dos alimentos. Em consequência da adição de ingredientes crus ou indevidamente cozinhados, a carga microbiana aumenta. E tanto mais no caso da sua permanência por períodos de tempo prolongados, especialmente à temperatura ambiente.

As carnes vermelhas e de aves e os produtos cárneos, indevidamente cozinhados, podem conter *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. coli*) (WHO, 2000; WHO 2007), *Salmonella* spp. (WHO, 2005) e *E. coli* O157:H7 (Sofos, 2007). Podem também ser contaminados por *L. monocytogenes* devido à sua natureza ubiqüitária, ao seu potencial de contaminação dos produtos após o processamento e à sua capacidade de multiplicação a temperaturas de refrigeração (Sofos, 2007). Grandes peças de carne indevidamente cozinhadas, conservas e produtos de charcutaria de fabrico caseiro (presunto e enchidos) pode conter *Cl. botulinum*, e ainda, no último caso, *Shigella*. Soares (2004), analisou carne assada identificando *B. cereus* em 7 amostras (14,0%) recolhidas em etapas subsequentes ao tratamento térmico, com contagens compreendidas entre 10^2 ufc/g e $2,4 \times 10^3$ ufc/g. A eliminação dos patogénicos pode conseguir-se com a aplicação de um tratamento térmico eficaz, isto é,

Introdução

com temperaturas iguais ou superiores a 70 °C, em todos os pontos do alimento (WHO, 2005).

Relativamente ao leite submetido ao tratamento de pasteurização, a sua microflora é constituída por organismos que resistem às temperaturas aplicadas e por aqueles que contaminam o produto no período entre o tratamento e a embalagem. Os primeiros são termodúricos (os *Micrococcus*, alguns *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis*), *Streptococcus* e determinados *Lactobacillus* (*Lactobacillus viridescens*)), esporos de *Bacillus* e *Clostridium*. Os últimos incluem coliformes, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *Flavobacterium*. Alguns microrganismos sensíveis ao calor podem contaminar o leite posteriormente à pasteurização e os psicotróficos podem crescer durante o armazenamento em refrigeração (Jay *et al.*, 2005).

Little *et al.* (2007) em estudos sobre a qualidade microbiológica de 2618 queijos frescos ou semi-duros produzidos a partir de leite pasteurizado observaram elevados valores de *S. aureus* (2 amostras; $1,9 \times 10^4$, $4,0 \times 10^4$ ufc/g) e *E. coli* (50 amostras variando de $1,1 \times 10^3$ a $\geq 10^7$ ufc/g). A contaminação por *Listeria* spp. (incluindo *L. monocytogenes*) nos queijos foi observada em 2,5% das amostras com contagens inferiores a 20 ufc/g. *Salmonella* spp. não foi detectada nas amostras examinadas. *L. monocytogenes* foi detectada em 0,2% das amostras de queijo à base de leite pasteurizado, e a sua prevalência foi semelhante à detectada na Irlanda em 2005 (0,11%, FSAI, 2006) e menor à previamente determinada em Espanha (1,0%; 1997–1999, Vitas *et al.*, 2004) e na Bélgica (54,5%; 2001–2002, Van Coillie *et al.*, 2004).

1.2 Microrganismos Causadores de Doença de Origem Alimentar

As doenças de origem alimentar constituem um dos maiores problemas de saúde pública. Associam-se maioritariamente a um conjunto de sintomas como vômitos, diarreia, náuseas, dores abdominais, sendo vulgarmente conhecidas por gastroenterites ou doenças diarreicas. Este tipo de doenças, também designadas por toxinfecções, surgem sob as mais diversas formas, desde ligeiras indisposições até situações mais graves que podem carecer de cuidados hospitalares ou mesmo causar a morte. Podem ocorrer sob duas apresentações clínicas: doença infecciosa geralmente causada por bactérias; intoxicação que pode ter origem bacteriana, química ou por contaminação através de toxinas de origem natural existentes nos próprios alimentos (Soares, 2007). A infecção é o processo resultante da ingestão de bactérias patogénicas vivas e, o inóculo, tem de ser suficiente para ultrapassar a barreira gástrica e, aqueles que sobrevivem, chegam ao intestino delgado (bactérias enteroinvasivas) onde se multiplicam e desenvolvem originando o aparecimento de sintomas. Nos processos de intoxicação alimentar não são os microrganismos que originam os sintomas mas sim as suas toxinas. Isto pressupõe que anteriormente houve no

Introdução

alimento o crescimento microbiano e produção de toxinas que são ingeridas conjuntamente com os alimentos (bactérias enterotóxicas) (Soares, 2007). As toxinfecções alimentares são causadas por microrganismos patogénicos tais como *Staphylococcus* spp., *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp. e *Yersinia* spp., vírus e príões (Sofos, 2007).

O Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, define os limites para *L. monocytogenes* e *Salmonella* nos alimentos prontos a consumir. Em geral, a *L. monocytogenes*, deve estar ausente em 25g do alimento pronto a consumir e, a *Salmonella*, consoante o alimento em causa, deve estar ausente em 25g ou em 10g deste.

Quando surgem pelo menos dois casos cuja sintomatologia é reportada à mesma origem alimentar, trata-se de uma toxinfecção alimentar colectiva (Vierling e Leyral, 2007), ou seja, segundo o “*Center for Disease Control and Prevention*” (CDC), “*Foodborne Disease Outbreak*”. O CDC estima que existam 76 milhões de doenças alimentares por ano e, consequentemente, cerca de 325 000 hospitalizações e 5 000 casos fatais. Aproximadamente 66% das toxinfecções alimentares colectivas são causados por bactérias patogénicas (Marriott e Gravani, 2006). Anualmente são referidas 200 destas doenças e, cerca de 60% são de etiologia indeterminada apesar de serem, possivelmente, causadas pelos microrganismos patogénicos mencionados neste trabalho.

Neste capítulo efectua-se uma descrição das bactérias patogénicas mais relevantes, responsáveis pelo desenvolvimento de doenças de origem alimentar.

1.2.1 *Staphylococcus* spp.

O género *Staphylococcus* é constituído por bactérias Gram-positivas, catalase-positivas, de forma esférica e imóveis (ausência de flagelos e cílios) (ICMSF, 1996; Joffin e Joffin, 2003; Jay *et al.*, 2005; Vierling e Leyral, 2007). São anaeróbias facultativas (ICMSF, 1996; Joffin e Joffin, 2003) e apresentam metabolismo fermentativo (Vierling e Leyral, 2007).

São bactérias ubíquas e estão presentes na pele e na mucosa nasal e perineal de seres humanos e animais (patogénico *S. aureus* e estirpes pouco virulentas) (ICMSF, 1996; Joffin e Joffin, 2003). Entre 25% e 40% da população saudável é portadora de *S. aureus* (WHO, 2008).

A presença de *Staphylococcus* spp. nos alimentos, pelo menos em reduzida quantidade, é expectável (ICMSF, 1996). A fonte de contaminação dos alimentos são os manipuladores e, caso o armazenamento não seja adequado, a bactéria pode multiplicar-se e produzir toxina (WHO, 2008). Os alimentos envolvidos em intoxicações são aqueles sujeitos a elevado manuseamento e preparados com antecedência relativamente ao consumo e muito manuseados tais como as carnes cozinhadas [as bactérias não competem

Introdução

adequadamente com a microflora normal pelo que a ausência dos microrganismos de competição é favorável (especialmente bactérias ácido-lácticas)], marisco (ICMSF, 1996), produtos de pastelaria e cremes (Joffin e Joffin, 2003), queijos e salames de fermentação incorrecta (ICMSF, 1996) e alimentos com baixo a_w (Vierling e Leyral, 2007).

Relativamente aos parâmetros de crescimento, requerem condições de temperatura, pH e a_w adequadas. Quanto à temperatura, o crescimento ocorre no intervalo compreendido entre 7 °C e 48 °C (o óptimo é de 35 °C a 40 °C). Quando o *S. aureus* é submetido a temperaturas entre -10 °C e 0 °C ocorre uma diminuição na sua viabilidade. A temperatura igual ou inferior a -20 °C é muito resistente e é rapidamente destruído aquando da confecção ou pasteurização dos alimentos. As enterotoxinas são extremamente resistentes ao tratamento térmico e, a gama de temperaturas para a produção de enterotoxinas, é mais restrita ocorrendo entre 10 °C e 46 °C (o óptimo verifica-se entre 40 °C e 45 °C (ICMSF, 1996). Quanto ao pH o crescimento ocorre para valores compreendidos entre 4,0 e 9,8 (óptimo entre 6,0 e 7,0) (Jay *et al.*, 2005) e abaixo de 6,0 a produção da toxina é limitada (WHO, 2008). A natureza do ácido influencia o limite inferior: com um ácido inorgânico pode ser inferior a 4,3; e, com ácidos orgânicos os valores são muito mais elevados. O valor de pH mínimo para a produção de enterotoxinas é de 5,1 (ICMSF, 1996). Todas as espécies são tolerantes à concentração salina, crescendo a 10% NaCl (ou 20% nalguns casos). No que respeita ao a_w é a bactéria patogénica mais resistente, crescendo a 0,83, contudo, a produção da toxina não ocorre para valores inferiores a 0,86.

Existem mais de 30 espécies e apenas as coagulase-positivas são, potencialmente, patogénicas – *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hycius*. Quando presentes nos alimentos podem ser ou não enterotoxigénicas e causar intoxicações alimentares (Joffin e Joffin, 2003; Jay *et al.*, 2005; Vierling e Leyral, 2007). As enterotoxinas são exoproteínas de massa molar reduzida (26000 - 34000 Da), excepcionalmente resistentes à temperatura, às enzimas digestivas e à acidez gástrica (ICMSF, 1996; Joffin e Joffin, 2003). Existem sete tipos de enterotoxinas, com potenciais de acção semelhantes mas propriedades físico-químicas distintas – A, B, C₁, C₂, C₃, D e E (Jay *et al.*, 2005). Joffin e Joffin (2003) referem ainda o tipo F e, Ikeda *et al.* (2004), os tipos G, H, I, J, K, L, M, N e O. Os tipos B e C são produzidos, maioritariamente, no fim da fase estacionária do crescimento enquanto os tipos A e E são produzidos durante a fase logarítmica (ICMSF, 1996). O *S. aureus* possui a capacidade de produzir uma grande variedade de enterotoxinas termorresistentes (Turcsányi *et al.*, 2007), na fase exponencial do crescimento (Vierling e Leyral, 2007). Santagada *et al.* (2007) referem que a maioria das estirpes *S. aureus* enterotoxigénicas produzem os tipos A, B, C e D em proporções de 18,4%, 6,4%, 15,2% e 33,6%, respectivamente. A maioria das intoxicações alimentares envolve as enterotoxinas dos tipos A e D mas outras podem estar

Introdução

presentes conjuntamente com A. O tipo E está envolvido em menor extensão (Kérouanton *et al.*, 2007).

As doenças são causadas pelas enterotoxinas produzidas (a patogenicidade de *S. aureus* deve-se unicamente à enterotoxina) e incluem infecção aguda (septicemia) e toxemia aguda (intoxicação alimentar) (Joffin e Joffin, 2003). Entre todos os agentes responsáveis por surtos de doenças de origem alimentar em 2006 na Europa, *Staphylococcus* spp. foi o agente responsável por 4,1% (236) destes sendo afectados 2057 indivíduos dos quais 277 foram hospitalizados e dois foram casos mortais. Dos surtos causados por toxinas bacterianas, *S. aureus* and *Staphylococcus* spp., foram os agentes responsáveis por 2053 e 320 entre 16 estados-membros da UE e 3 estados não-membros, respectivamente, dos quais 16% representaram hospitalizações. A toxina produzida por *S. aureus* é responsável por 48,8% dos surtos causados por toxinas bacterianas reportados por todos os países da UE e por 40% de todos os surtos reportados em 2006 (EFSA, 2007).

A dose de toxina suficiente e necessária para causar intoxicação alimentar é de 0,1 a 1 µg/kg (ICMSF, 1996). A doença possui um curto período de incubação, 2 a 4 horas após ingestão da toxina (Leyral e Vierling, 2007), ao fim do qual surgem os sintomas. Consistem em diarreia, vómitos, náuseas, dores abdominais e, em casos severos, pode ocorrer dores musculares e de cabeça e colapso (ICMSF, 1996; Joffin e Joffin, 2003; Marriott e Gravani, 2006). A recuperação é rápida pois os sintomas cessam ao fim de dois dias e, geralmente, não se verificam sequelas (ICMSF, 1996; Joffin e Joffin, 2003). Aparentemente, os indivíduos não possuem imunidade a ataques recorrentes (Marriott e Gravani, 2006). A taxa de mortalidade é extremamente reduzida, inferior a 0,02%, podendo ocorrer em indivíduos imunocomprometidos, crianças ou idosos (Marriott e Gravani, 2006; WHO, 2008).

1.2.2 *Clostridium perfringens*

Cl. perfringens é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos e imóvel (Vierling e Leyral, 2007). Pode crescer em condições não estritamente anaeróbicas tolerando, no máximo, uma concentração de 5% de oxigénio (ICMSF, 1996; Jay *et al.*, 2005).

A bactéria e os esporos são ubíquos e, por isso, a sua presença pode ser detectada no solo, na vegetação, em poeiras e detritos, água e flora intestinal normal do Homem e animais (ICMSF, 1996; Jay *et al.*, 2005; Vierling e Leyral, 2007). Estas são as fontes de contaminação dos alimentos e, os mais preocupantes, são os pratos de carnes vermelhas e de aves sujeitos a combinações de tempo-temperatura abusivas que, posteriormente, permanecem à temperatura ambiente ou são submetidos a arrefecimento inadequado. Isto permite que os esporos resistam ao processo de confecção, germinem e cresçam produzindo um elevado número de células vegetativas. Caso um prato não seja

Introdução

suficientemente reaquecido antes do consumo, as células vegetativas podem causar doença (ICMSF, 1996; Joffin e Joffin, 2003; Vierling e Leyral, 2007; WHO, 2008).

O crescimento ocorre para temperaturas compreendidas entre 15 °C e 50 °C (ótimo entre 43 °C e 46 °C), contudo, quando inferior a 20 °C, é muito lento mas, para uma temperatura ótima entre 43 °C e 46 °C, é extremamente rápido. Consequentemente, as células vegetativas são rapidamente destruídas pelos tratamentos térmicos e são muito sensíveis à congelação. Os esporos são resistentes ao tratamento térmico sendo completamente destruídos quando estes sejam severos pois a 100 °C são detectados. A enterotoxina, em molhos de carne, é inactivada entre 59 °C e 65 °C entre 1,5 e 72,8 minutos (ICMSF, 1996). Relativamente à acidez, o crescimento ocorre numa gama de pH de 5,0 a 9,0 sendo o ótimo entre 6,0 e 7,0 (WHO, 2008). Não é particularmente tolerante a reduzido a_w e, algumas estirpes cessam o crescimento para valores compreendidos entre 0,95 e 0,97. Algumas estirpes *Cl. perfringens* produzem enterotoxinas termorresistentes, de natureza proteica cuja massa molar é de 50 Kg.mol⁻¹ (Joffin e Joffin, 2003). Consoante a enterotoxina produzida distinguem-se cinco grupos *Cl. perfringens*: A, B, C, D, e E. Os tipos A, C e D são patogénicos para o Homem (ICMSF, 1996) e, quando ingeridos no alimentos, podem causar intoxicação alimentar (Jay *et al.*, 2005; Vierling e Leyral, 2007). A secreção da enterotoxina é regulada pela esporulação – aquando da ingestão de um alimento que contém elevado número de células vegetativas, apesar de serem destruídas a nível gástrico (assim como as toxinas), os esporos passam livremente para o intestino onde ocorre esporulação e, por lise celular, a toxina é libertada (ICMSF, 1996; Joffin e Joffin, 2003; Vierling e Leyral, 2007). Os tipos A e C são produzidos no intestino em elevadas quantidades, contudo, podem também ocorrer em determinados alimentos (em reduzidas quantidades), contribuindo para o desenvolvimento de sintomas (ICMSF, 1996). Quantidades reduzidas de enterotoxinas podem ser produzidas, por algumas células, durante o crescimento vegetativo (Jay *et al.*, 2005). O *Cl. perfringens* é a espécie do género *Clostridium* que mais frequentemente está associada a intoxicações alimentares (Vierling e Leyral, 2007). A gastroenterite é causada pela toxina. De acordo com o registado por 9 estados-membros e um estado não-membro da UE em 2006 ocorreram 63 surtos provocados pelo *Cl. Perfringens*. Estes casos representaram 29,4% do total de infecções provocadas por toxinas de origem bacteriana; 11 indivíduos necessitaram de ser hospitalizados ocorrendo um caso mortal (EFSA, 2007). Deste modo, a taxa de mortalidade, em países industrializados, é inferior a 0,1% (WHO, 2008). É necessária uma concentração de bactérias activas elevada para desencadear o processo patológico, ou seja, 10⁶-10⁸ (Vierling e Leyral, 2007). Os sintomas surgem entre 8 a 24 horas após a ingestão dos alimentos contaminados e consistem em diarreia profusa e dores abdominais e, raramente, vómitos e febre (ICMSF, 1996; WHO, 2008). A recuperação

Introdução

ocorre rápida e espontaneamente (Joffin e Joffin, 2003), ou seja, ao fim de 24 a 48 horas (ICMSF, 1996; Leyral e Vierling, 2007).

1.2.3 *Clostridium botulinum*

Esta bactéria é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos e móvel por meio de flagelos. É responsável pela produção de sete potentes neurotoxinas imunologicamente distintas (A, B, C, D, E, F e G) as quais correspondem a sete tipos de *Cl. botulinum*. São potencialmente letais em doses muito reduzidas, isto é, a dose mortal mínima é a ordem de 30 µg/kg (Joffin e Joffin, 2003; Vierling e Leyral, 2007; WHO, 2008). Apenas a A, B, E e, em menor extensão a F estão associadas à doença em seres humanos (WHO, 2008). Destas toxinas, a tipo A é superior relativamente a B e a E nos efeitos produzidos. As características bioquímicas são sensivelmente diferentes permitindo a classificação nos grupos I, II, III e IV (Vierling e Leyral, 2007). As toxinas são proteínas de elevado peso molecular, aproximadamente 160 000 g.mol⁻¹, produzidas na fase exponencial do crescimento e libertadas na fase estacionária (Joffin e Joffin, 2003; Vierling e Leyral, 2007). São constituídas por duas cadeias ligadas por pontes dissulfido: A – contém o domínio catalítico; B – contém os domínios responsáveis pelo estabelecimento da ligação aos receptores (Joffin e Joffin, 2003; Vierling e Leyral, 2007).

O habitat desta bactéria é o solo, o tracto intestinal de animais e, possivelmente, do Homem (Joffin e Joffin, 2003). Consequentemente, a doença ocorre quando os alimentos crus ou indevidamente processados são armazenados em condições anaeróbias permitindo o crescimento do organismo. A maioria dos casos de doença deve-se a métodos de conservação incorrectos, como por exemplo, o enlatamento, a fermentação, a cura, a fumagem e a conservação por ácido ou óleo (WHO, 2008). Os veículos incluem os vegetais, os condimentos, o peixe e os derivados (tipo E), a carne e produtos cárneos (Joffin e Joffin, 2003; Vierling e Leyral, 2007; WHO, 2008).

A espécie *Cl. botulinum* é constituída por estirpes proteolíticas e estirpes não proteolíticas que diferem quanto ao tipo de toxinas produzidas e exigem quanto aos parâmetros necessários ao crescimento. Deste modo, as estirpes proteolíticas produzem as toxinas tipo A, B e F e são mesófilas, crescendo numa gama de temperaturas compreendida entre 10 °C e 50 °C enquanto as estirpes não-proteolíticas produzem as toxinas tipo B, E e F e são psicrotróficas pois crescem a temperaturas tão reduzidas como 3,3 °C. São resistentes às enzimas digestivas e à acidez gástrica (Joffin e Joffin, 2003). Relativamente ao a_w o valor mínimo é de 0,93-0,94. O pH mínimo é de 4,6 e 5,0 para as estirpes proteolíticas e não-proteolíticas, respectivamente (WHO, 2008). Os esporos são resistentes às temperaturas de confecção dos alimentos e, sobrevivem a tratamentos de desidratação e a condições de refrigeração. As neurotoxinas são sensíveis ao calor (podem ser destruídas

Introdução

a 80 °C em dez minutos ou à temperatura de ebulição em poucos minutos) e, quando submetidas a tratamento térmico, podem ser irreversivelmente desnaturadas, afectando negativamente a sua toxicidade (Joffin e Joffin, 2003). O crescimento é inibido pelo cloreto de sódio (concentração deve ser inferior a 10%), nitratos (inferior a 200 ppm) e nitritos (Joffin e Joffin, 2003; Vierling e Leyral, 2007). O *Cl. botulinum* é incapaz de crescer e produzir toxinas em presença de elevado número de microrganismos de diferente natureza.

O botulismo alimentar é uma doença rara e resulta da ingestão da toxina pré-formada nos alimentos contaminados. O estudo baseado nos casos reportados por 16 estados-membros e 3 estados não-membros da UE revelaram a ocorrência de 33 casos provocados por toxinas produzidas pelo *Cl. botulinum*. Todos eles necessitaram de hospitalização verificando-se um caso mortal (EFSA, 2006). O período de incubação é muito variável e, geralmente, é de 12 a 36 horas e a duração pode ser de dias a 8 meses (WHO, 2008). Os sintomas iniciam-se por fraqueza, fadiga e vertigens e, no decurso da doença, manifesta-se visão dupla, dificuldade em falar e deglutir. A diarreia pode manifestar-se em fases recentes e a obstipação persiste nas etapas mais avançadas. Nas formas mais graves a paralisia atinge os músculos respiratórios e, a morte por asfixia, pode ocorrer em 24 horas (ICMSF, 1996; Leyral e Vierling, 2007). A duração pode levar entre semanas a 8 meses. Caso o tratamento não seja imediato e adequado a taxa de mortalidade é elevada (Hui *et al.*, 2001) e, em países industrializados, pode ser de 5% a 10% (WHO, 2008). O botulismo infantil ocorre pela ingestão de esporos (o veículo alimentar mais frequente é o mel), colonização do tracto intestinal de bebés saudáveis com idade inferior a um ano e produção da toxina. Os sintomas consistem em obstipação, fraqueza generalizada e várias desordens neurológicas (ICMSF, 1996).

1.2.4 *Bacillus cereus*

B. cereus é um bacilo Gram-positivo, produtor de esporos termorresistentes, anaeróbio facultativo, catalase-positivo, oxidase-negativo e móvel (Vierling e Leyral, 2007; WHO, 2008).

É uma bactéria telúrica e está presente, em pequena quantidade, na flora intestinal. Os seus esporos são veiculados por poeiras (Jay *et al.*, 2005; Vierling e Leyral, 2007).

O modo de transmissão deve-se à ingestão de alimentos armazenados à temperatura ambiente após a confecção, permitindo o crescimento dos esporos e a produção da toxina. Os alimentos nos quais a bactéria e as toxinas podem estar presentes são os alimentos frescos, minimamente processados e/ou os alimentos processados pelo calor (vegetais, arroz, leite e produtos lácteos, molhos, sopas, carnes cruas e produtos à base de carne) (Arnesen *et al.*, 2006; Marriott e Gravani, 2006; Martínez *et al.*, 2007; Vierling e Leyral, 2007).

Introdução

A temperatura para a qual o crescimento das estirpes mesófilas é possível está compreendida no intervalo entre 10 °C e 50 °C, sendo o óptimo de 28 °C a 37 °C (Jay *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2007; Vierling e Leyral, 2007; WHO, 2008). As últimas estão mais envolvidas no desencadeamento da doença. As estirpes psicrotróficas crescem a 4-5 °C mas não a 30-35 °C e são mais importantes na contaminação dos alimentos. A capacidade de germinação dos esporos das estirpes eméticas a 7 °C e a 30 °C é inferior relativamente à das estirpes diarreicas. A resistência térmica dos esporos é moderada e, Martínez *et al.* (2007), referem que quando submetidos a tratamento térmico tornam-se mais sensíveis e, por isso, necessitam de um meio rico em nutrientes para a recuperação. Relativamente à produção da toxina emética, Agata *et al.* (2002) referem que ocorre para temperaturas compreendidas entre 30 °C e 35 °C. Segundo Van Coillie *et al.* (2005) e Wijnands *et al.* (2006) aquela é favorecida no intervalo entre 12 °C e 15 °C. Para Arnesen *et al.* (2006), a produção de enterotoxina a 37 °C é, aparentemente, reduzida. Várias estirpes demonstraram capacidade para produzir enterotoxina, a níveis elevados, quando as temperaturas de crescimento são de 25 °C e 32 °C. O pH que permite o crescimento está compreendido entre 4,9 e 9,3 mas varia entre as estirpes e depende da substância acidificante. Por exemplo, num meio com HCl verifica-se para valores de 4,8 e, quando está presente o ácido láctico, o pH de crescimento é de 5,6. Wijnands *et al.* (2006) verificaram que ao fim de 1 hora com pH igual a 2,5, não houve a completa inactivação dos esporos; e, quando a pH igual a 1,0 a inactivação foi limitada. Relativamente ao a_w , o valor mínimo para que o crescimento ocorra é de 0,91. A taxa de mortalidade é relativamente lenta em substratos cuja concentração salina (NaCl) é igual ou inferior a 5% e, com pH de 6,0 ou 7,5 (ICMSF, 1996).

Estas bactérias produzem uma grande variedade de toxinas extracelulares e enzimas, incluindo a lecitinase, proteases, β -lactamase, esfingomielinase, cerolisina e hemolisina BL e enterotoxina não-hemolítica (NHE) (Jay *et al.*, 2005). Igualmente produzem dois tipos de toxinas que são segregadas na fase exponencial de crescimento: a toxina emética, termoestável, de reduzida massa molar; e a toxina diarreica (semelhante às de *E. coli* e *V. cholerae*), termolábil, com elevado massa molar. A primeira é representada por cereulida e, é responsável pela síndrome emética (vómitos) a qual consiste numa intoxicação alimentar devido à produção da toxina no alimento. A última é responsável pela síndrome diarreica e consiste numa toxinfecção pela produção da toxina no tracto digestivo ou no alimento (WHO, 2008).

Na totalidade dos casos reportados em 2006 por 16 estados-membros e 3 estados não-membros da UE, o *B. cereus* foi o agente responsável por 77 surtos causando 17,1% das infecções cuja causa foram as toxinas bacterianas. O número total de casos foi de 941

Introdução

dos quais 34 necessitaram de hospitalização não se verificando, no entanto, ocorrência de mortes (EFSA, 2007).

A síndrome emética deve-se ao consumo de uma quantidade superior a 10 toxinas por grama de alimento e o período de incubação é de 1 a 5 horas após a ingestão de alimentos contaminados com a toxina e permanecem por um período compreendido entre 24 e 36 horas (McLauchlin e Little, 2007; WHO, 2008); os sintomas (semelhantes aos causados por intoxicações estafilocócicas) (Marriott e Gravani, 2006) consistem em náuseas, vômitos, dores abdominais e, por vezes, diarreia) A síndrome diarreica (semelhante à infecção por *Cl. perfringens*) manifesta-se entre 8 a 16 horas após a ingestão de uma dose infecciosa de 10^5 - 10^6 ; os sintomas consistem em diarreia aquosa aguda, náuseas e dores abdominais na ausência de febre e, permanecem entre 24 a 36 horas (Joffin e Joffin, 2003; McLauchlin e Little, 2007; Vierling e Leyral, 2007; WHO, 2008).

1.2.5 *Listeria monocytogenes*

As bactérias do género *Listeria* são constituídas por pequenos bacilos Gram-positivos, não formadoras de esporos, móveis por meio de flagelos, geralmente catalase-positivas, oxidase-negativa (Vierling e Leyral, 2007) e anaeróbias facultativas.

Este género é constituído por espécies antigenicamente distintas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* (17 serótipos). A principal espécie patogénica responsável pela maioria das infecções nos humanos e animais é a *L. monocytogenes* (13 serótipos) (Jay *et al.*, 2005).

Estão amplamente distribuídas na natureza sendo frequentemente encontradas no solo, detritos, excrementos animais, água e vegetais. Outras fontes de contaminação podem ser os animais e seres humanos infectados (WHO, 2008).

O género *Listeria* apresenta a particularidade de crescer a 4 °C e a *L. monocytogenes* desenvolve-se no intervalo compreendido entre 3 °C e 45 °C (ótimo entre 30 °C e 37 °C) (Vierling e Leyral, 2007). É facilmente destruída pelo calor, isto é, 30 minutos a 55 °C e 1-2 minutos a 100 °C é suficiente para eliminar a bactéria. Suporta um pH de 5,6 a 9,6 com óptimo entre 7,2 e 7,6 e não é muito sensível à acidez (Vierling e Leyral, 2007; WHO, 2008). Para a *L. monocytogenes* o a_w ocorre para valores superiores a 0,92 e é capaz de crescer numa concentração de 10% de NaCl (WHO, 2008). A *Listeria* requer, pelo menos, 4 vitaminas do complexo B (biotina, riboflavina, tiamina e ácido tióico) e aminoácidos (cisteína, glutamina, isoleucina e valia). A glucose favorece o crescimento, podendo verificar-se a fermentação de outros hidratos de carbono simples e complexos por algumas estirpes. O ferro é importante para o crescimento de *L. monocytogenes*.

Introdução

Em geral, é esperado que *Listeria* esteja presente onde ocorrem bactérias ácido-lácticas, *Brochothrix* e algumas bactérias corineformes. Os veículos alimentares mais importantes são o leite cru, queijos de pasta mole, pastas à base de carne e vegetais crus.

Em 2006 foram reportados por 25 estados-membros da UE 1,583 casos confirmados de listeriose, sendo a incidência de 0,3 por 100,000 habitantes. Este número foi superior relativamente aos dois últimos anos e, considerando os cinco anos anteriores, esse aumento verificou-se de modo significativo (EFSA, 2007).

Uma concentração de *Listeria* reduzida não representa um perigo para a saúde, à excepção da população de risco a qual consiste em mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos, indivíduos imunodeprimidos (Butt *et al.*, 2004; Walls e Buchanan, 2005; Marriott e Gravani, 2006; Vierling e Leyral, 2007). Segundo dados da EFSA (2007) a doença ocorre, maioritariamente, entre adultos e idosos, com 56% dos casos ocorrendo em indivíduos com idades superiores a 65 anos.

Os serótipos mais frequentemente envolvidos são 1/2a (frequentemente detectado nos alimentos) e 4b (associado a casos de mortalidade) (Kiss *et al.*, 2006). Os sintomas de listeriose surgem num período de 4 dias a várias semanas e, os mais comuns são: sintomas gripais (febre, fadiga, mal-estar, náuseas, cólicas, vômitos e diarreia), septicemia, endocardite, abscessos, osteomielite, encefalite, lesões localizadas ou minigranulomas (no fígado, vesícula biliar, pele e nódulos linfáticos) e meningoencefalopatia em adultos e imunodeprimidos (Butt *et al.*, 2004; Walls e Buchanan, 2005; Marriott e Gravani, 2006; Vierling e Leyral, 2007); as mulheres grávidas apresentam uma síndrome pseudo-gripal, faringite ou diarreia e, por infecção transplacentária, pode conduzir a aborto ou parto prematuro de um bebé infectado. Nestes, após o nascimento, ocorre septicemia (elevada taxa de mortalidade) frequentemente associada a uma síndrome de meningite, (Butt *et al.*, 2004; Vierling e Leyral, 2007). Na generalidade dos casos a taxa de mortalidade é de 20-30%, sendo no caso de recém-nascidos de 30 % e próximo de 50% quando a infecção ocorre nos primeiros 4 dias após o nascimento.

1.2.6 *Salmonella* spp.

Este género é composto por bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e móveis (através de fímbrias) pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e, como tal, fermentam a glucose, reduzem os nitratos a nitritos e são oxidase-negativas (Vierling e Leyral, 2007; WHO, 2008). Ainda apresentam a capacidade de produzir sulfureto de hidrogénio. Contêm uma lisina-descarboxilase e são desprovidos de urease e triptofano-desaminase (Vierling e Leyral, 2007).

Existem duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, e considerando antígenos de parede (O) ou flagelares (H), distinguem-se cerca de 2 200 serótipos (Joffin e Joffin, 2003;

Introdução

Vierling e Leyral, 2007). São identificados três grupos epidemiológicos: serótipos que apenas afectam seres humanos (*S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B*); serótipos adaptadas ao hospedeiro (*S. Gallinarium*, *S. Dublin*, *S. Abortus-equi*, *S. Abortus-ovis* e *S. Choleraesuis*); e, serótipos inadaptados. A patogenicidade é superior para *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* e *S. Enteritidis* e inferior para *S. Pullorum* e *S. Galinarium*.

Estão amplamente distribuídos na natureza mas o principal reservatório é o tracto intestinal de seres humanos (pacientes e portadores em convalescença) e animais domésticos e selvagens (aves, suínos, caprinos, roedores e de companhia) (WHO, 2008).

Salmonella spp. pode sobreviver a valores extremos de pH, ausência de nutrientes, deficiência de oxigénio, choques osmótico e térmico (Hakalehto *et al.*, 2007). Segundo Juneja e Marks (2006), o crescimento é rápido a temperaturas entre 25 °C e 37 °C e, *S. Typhimurium* cresce entre 6,2 °C e 45 °C (Jay *et al.*, 2005). Podem sobreviver ao tratamento térmico letal tornando-se viáveis, isto é, a 55 °C e, quanto maior for a temperatura de crescimento maior será a resistência térmica (*S. Senftenberg* 775W é o serótipo de maior resistência térmica). O pH necessário ao crescimento ocorre entre 3,8 e 9,0 (ótimo próximo da neutralidade). *Salmonella* spp. não tolera concentrações salinas elevadas pelo que, uma concentração superior a 9% exerce efeito bactericida e, o limite mínimo do a_w é de 0,94 (ICMSF, 1996). Hakalehto *et al.* (2006) referem que em aerobiose o crescimento é, geralmente, mais eficiente e, Dunkley *et al.* (2008) mencionam que as taxas de crescimento de *S. Enteritidis*, em aerobiose e em anaerobiose (nitrogénio) foram semelhantes. São incapazes de fermentar a lactose (raramente alguns serótipos podem utilizá-lo), a sacarose ou salicina enquanto a glucose e outros monossacáridos podem ser utilizados. Normalmente recorrem a aminoácidos como fonte de azoto e, *S. Typhimurium* utiliza unicamente a nitrato, nitrito e amoníaco como fonte de azoto.

A transmissão ocorre pela ingestão de alimentos provenientes de animais infectados (leite não pasteurizado, carnes vermelhas e de aves indevidamente cozinhadas, peixe, marisco, ovos crus e ovoprodutos, especiarias, saladas e chocolate) (Joffin e Joffin, 2003; Marriott e Gravani, 2006; Vierling e Leyral, 2007; WHO, 2008). Outras causas podem ser a contaminação cruzada dos alimentos resultante de más práticas de higiene, manipuladores, animais, insectos e pragas e seus detritos. Esta contaminação pode agravar-se caso as temperaturas de armazenamento permitam o crescimento da bactéria (WHO, 2008).

Em 2006, na UE, verificou-se um total de 160,649 casos confirmados de Salmonelose em seres humanos sendo a incidência de 34,6 casos por 100,000 habitantes. Em Portugal, o total de casos confirmados de doença, foi de 387 representando uma incidência de 3,7 casos por 100,000 habitantes. Em ambos os casos, a tendência relativamente a anos anteriores, foi a diminuição do número de casos e, na EU, o decréscimo foi significativo verificando-se uma diminuição de 18,1% desde 2004 e de 7,6%

Introdução

desde 2005. Os serótipos mais comuns foram *S. Enteritidis* (PT4) e *S. Typhimurium* (DT 104), representando 75% de todos os tipos em 2006 e 82% em 2005 (EFSA, 2007). A gastroenterite deve-se à ingestão de alimentos contaminados com quantidades significativas destes patogénicos e, *S. Enteritidis* está mais frequentemente associado ao consumo de ovos e carne de frango, enquanto *S. Typhimurium* está mais associado ao consumo de carne de porco, de vaca e de aves (Joffin e Joffin, 2003; Butt *et al.*, 2004; EFSA, 2007; Hughes *et al.*, 2007).

As salmoneloses são causadas por estirpes de poder patogénico distinto e podem ser a febre tifóide e paratifóide e a toxinfecção alimentar. As primeiras correspondem a uma infecção sistémica de manifestação muito lenta causada por *S. Typhi* que se inicia por breves distúrbios gastrointestinais, seguindo-se um longo período de incubação (8 a 28 dias) e, posteriormente, febres elevadas e cólicas abdominais sendo comum bacteriemia, diarreia aquosa e dores abdominais persistentes que podem persistir entre 1 a 3 semanas (Hui *et al.*, 2001); a bactéria propaga-se a partir do tracto gastrointestinal para outros órgãos (sistema linfático e sanguíneo, baço e fígado) produzindo uma infecção generalizada (Hui *et al.*, 2001); a recuperação é possível sendo a taxa de mortalidade inferior a 1% em indivíduos submetidos a tratamento; os indivíduos que sofram desta infecção tornam-se transportadores assintomáticos de *S. Typhi* (Hui *et al.*, 2001). Relativamente às toxinfecções alimentares, geralmente, é necessária uma dose superior a 10^6 por grama, em indivíduos adultos; em crianças e idosos é suficiente uma dose inferior (Joffin e Joffin, 2003; Marriott e Gravani, 2006; Vierling e Leyral, 2007); o período de incubação é, em média, de 12 a 24 horas e, a gravidade da sintomatologia é inferior manifestando-se sob a forma de náuseas, vómitos, febre, diarreia (drástica sem sangue), dores musculares e abdominais podendo ser antecidos de arrepios, dores de cabeça e mialgia (Hui *et al.*, 2001; Butt *et al.*, 2004; Marriott e Gravani, 2006); a recuperação ocorre, geralmente, entre 24 a 48 horas e os casos fatais, nos países industrializados, é inferior a 1% (WHO, 2008). Os grupos etários de maior risco são os representados por crianças até aos 4 anos e entre os 5 e 14 anos sendo que, para o primeiro, o número de casos reportados foi, aproximadamente, três vezes superior (EFSA, 2007).

Os casos reportados ocorreram maioritariamente no verão e no outono verificando-se um rápido declínio nos meses de inverno, o que é suportado pelas temperaturas e comportamentos (hábitos de consumo) (EFSA, 2007).

Introdução

1.2.7 *Shigella* spp.

Este género pertence à família *Enterobacteriaceae* e é constituído por bacilos Gram-negativos, oxidase-negativos, não formadoras de esporos, anaeróbios facultativos e imóveis. É semelhante a *E. coli* em algumas características bioquímicas (ICMSF, 1996).

Não estão naturalmente presentes no ambiente e a sua presença deve-se a seres humanos, primatas superiores na fase aguda da doença, pacientes em convalescença e a excretores saudáveis. A transmissão ocorre por contaminação fecal, alimentar e por insectos (ICMSF, 1996).

A *Shigella* spp. não é particularmente resistente a condições ambientais desfavoráveis. As seguintes características são favoráveis ao crescimento: temperatura compreendida entre 10 °C e 48 °C (ótimo a 37 °C); pH entre 6,0 e 8,0 (não sobrevive a pH inferior a 4,5); a_w mínimo de 0,97 (WHO, 2008).

As características bioquímicas e serológicas são distintas entre as espécies, o que permite a seguinte classificação: sub-grupo A (*S. dysenteriae*); sub-grupo B (*S. flexneri*); sub-grupo C (*S. boydii*); e, sub-grupo D (*S. sonnei*). Os serótipos são caracterizados pelos antígenos somáticos O (não possuem antígenos flagelares) (ICMSF, 1996) e, o número representativo de cada sub-grupo é de 12, 6, 23 e 1 serótipos, respectivamente. Conforme as propriedades patogénicas podem distinguir-se três grupos distintos: *S. dysenteriae* 1, com propriedades invasivas e produtoras de elevados níveis de toxina Shiga; outras *Shigella* invasivas e não produtoras de elevados níveis de toxina; e, estirpes não invasivas, produtoras de toxinas Vero ou semelhantes Shiga (*S. flexneri* e *S. sonnei* produzem baixos níveis) (ICMSF, 1996). A toxina Shiga é solúvel, termolábil e possui actividades citotóxica (alteração da permeabilidade e morte das células epiteliais intestinais), enterotóxica e neurotóxica (ICMSF, 1996). Outra substância presente em todas as bactérias, envolvida no processo invasivo, é a endotoxina lipopolissacarido (LPS) cuja função é, provavelmente, a protecção da bactéria em relação ao sistema imunitário do hospedeiro (ICMSF, 1996).

O modo de transmissão é devido a alimentos e água contaminada com matérias fecais, via oral-fecal, manipuladores com reduzidas práticas de higiene pessoal ou pelo uso de detritos e águas residuais aquando da fertilização. Os alimentos sujeitos a elevada manipulação e indevidamente cozinhados como saladas (atum e peru, camarão e vegetais), água e leite cru, são importantes veículos da bactéria (ICMSF, 1996; Hui *et al.*, 2001; WHO, 2008).

A Shigelose ou disenteria bacilar é a gastroenterite causada pelo género *Shigella*. O principal patogénico responsável pela forma clássica da doença é *S. dysenteriae* (maior severidade). *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei* são agentes etiológicos de gastroenterite de origem alimentar severa ou ligeira (Hui *et al.*, 2001; Vierling e Leyral, 2007). Oito estados-membros e um estado não-membro da UE em 2006 reportaram 33 surtos causados por

Introdução

Shigella (0,6% na totalidade dos surtos) envolvendo 138 indivíduos, dos quais 15,9% foram hospitalizados (EFSA, 2007).

A bactéria é altamente infecciosa e, a dose infecciosa é reduzida (10-100) (ICMSF, 1996; Hui *et al.*, 2001). O período de incubação da doença é de 1 a 4 dias e, é caracterizada pelo súbito aparecimento de dores abdominais, vômitos, febre e diarreia que varia de aquosa (*S. sonnei*) a desintéria com fezes sanguinolentas e com muco (*S. dysenteriae* e, em menor extensão, *S. flexneri* e *S. boydii*), sintomas semelhantes aos causados por *E. coli* patogénica, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp.. A doença pode progredir e, em 1 a 3 dias, as fezes possuem sangue e muco e, na fase de maior gravidade, é caracterizada por dores intensas e frequentes movimentos intestinais (ICMSF, 1996; Hui *et al.*, 2001; Vierling e Leyral, 2007; WHO, 2008). Apesar de ser uma doença severa é autolimitante e, caso o tratamento não seja efectuado, permanece por 1 a 2 semanas. Em indivíduos saudáveis a doença não representa uma ameaça, no entanto, para crianças malnutridas, idosos e imunocomprometidos pode ser letal. A taxa de mortalidade normalmente é reduzida para o primeiro grupo mas em países em desenvolvimento é a maior causa de morte infantil (Hui *et al.*, 2001).

1.2.8 *Escherichia coli*

É um bacilo pertencente à família *Enterobacteriaceae* e, como tal, é Gram-negativa, catalase-positiva, oxidase-negativa, não formadora de esporos e anaeróbia facultativa. A maioria das estirpes fermenta a lactose, apesar de algumas esta ocorrer lentamente (ICMSF, 1996). Podem possuir fímbrias que desempenham funções na patogenicidade por permitirem a aderência (ICMSF, 1996).

O seu habitat natural é o tracto intestinal de seres humanos e outros animais de sangue quente (McLauchlin e Little, 2007; WHO, 2008).

O crescimento pode ocorrer em meio reduzido contendo apenas uma fonte de carbono orgânico (glucose) e uma fonte de nitrogénio ((NH₄)₂SO₄) (Jay *et al.*, 2005). As temperaturas de crescimento estão compreendidas entre 7 a 10 °C e 50 °C (ótimo entre 30 °C a 37 °C). O efeito do pH está dependente do tipo de ácido presente e, geralmente, verifica-se entre 4,4 e 8,5 (em meio com HCl o pH de crescimento é de 4,5) mas *Escherichia coli* Enterohemorrágica é o grupo mais resistente à acidez no género *E. coli*. Quanto ao a_w, o mínimo valor é de 0,95 e, concentrações de 6% de NaCl permitem o crescimento (WHO, 2008).

Existem quatro grupos de *E. coli* e a sua classificação é efectuada de acordo com: a virulência, serologia (antigenes somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K)), interacções com a mucosa intestinal, síndrome clínica e epidemiologia (ICMSF, 1996). Os serótipos mais importantes são: *E. coli* Enteropatogénica (EPEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E.*

Introdução

coli Enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC). Do ponto de vista da segurança alimentar as estirpes *E.coli* de maior importância são as que produzem verotoxinas (VTEC) e pertencem ao grupo EHEC (McLauchlin e Little, 2007). Segundo a EFSA (2007), em 2006 um total de 4,916 casos confirmados de VTEC foram reportados por 22 estados-membros da UE. Isto representa um aumento de 1,694 de casos relativamente ao ano de 2005. A incidência foi de 1,1 por 100,000 habitantes e, registou-se uma redução significativa desde 2004. O serótipo VTEC mais frequentemente associado foi O157. Na generalidade, mais de metade destes casos ocorreram em crianças até aos 4 anos de idade. Verificou-se uma sazonalidade marcada nos casos humanos de VTEC sendo muitos deles reportados durante o verão e Outono (EFSA, 2007).

Os alimentos envolvidos nos casos de doenças são a carne, leite cru e vegetais. A transmissão secundária (indivíduo a indivíduo) pode ocorrer durante a excreção do patogénico (WHO, 2008).

1.2.8.1 *Escherichia coli* Enteropatogénica

Os serótipos mais relevantes de EPEC são: O55, O86, O11, O119, O125, O126, O127, O128ab e O142. (Hui *et al.*, 2001).

A bactéria ocorre no hospedeiro por via de águas não tratadas ou de alimentos cuja contaminação é de origem fecal (McLauchlin e Little, 2007). A gastroenterite afecta, especialmente, crianças muito jovens (25% das infecções em crianças nos países em desenvolvimento, ou seja, maior causa de diarreia infantil severa) e é rara em adultos (portadores da bactéria no trato intestinal devido à imunidade adquirida) (WHO, 2008). A dose infecciosa é reduzida (McLauchlin e Little, 2007). Esta bactéria adere à mucosa e altera a sua capacidade de absorção, causando sintomas como vómitos, diarreia, dores abdominais e febre. O período de incubação é de 1 a 6 dias podendo, contudo, ser mais reduzido, isto é, 12 a 36 horas e, a duração da doença pode ser de dias a semanas (WHO, 2008). A percentagem de casos fatais, em países industrializados é inferior a 0,1% (WHO, 2008).

1.2.8.2 *Escherichia coli* Enterotoxigénica

A transmissão da bactéria ocorre pelo consumo de alimentos e água contaminada por matérias fecais, abuso do binómio tempo-temperatura na confecção de determinados alimentos (WHO, 2008).

O mecanismo de patogenicidade consiste em duas etapas, a colonização do intestino delgado e a produção de enterotoxinas. A aderência é mediada por fímbrias imunogénicas, “*colonization factor antigens*” (CFA), que actuam como ligandos específicos das células bacterianas a um receptor específico das células-alvo, um complexo de hidratos

Introdução

de carbono. De seguida, ocorre produção de enterotoxinas que são termoestáveis (ST) e termolábeis (LT). LT é constituída por duas subunidades (A e B) e, inicialmente, B estabelece ligação ao gangliósido nas células epiteliais do intestino e, de seguida, A entra na célula e provoca aumento da secreção e diminuição da absorção. ST pode apresentar mais do que uma forma (STA e STB) e, aparentemente, exerce maior acção como anti-absorvente; é extremamente resistente ao tratamento térmico (100 °C durante 15 minutos) (ICMSF, 1996). STA, cujo peso molecular é de 1972 Da, origina reacções que resultam na alteração do metabolismo hidrossalino da mucosa intestinal aumentando a secreção de electrólitos e água no lúmen, ocorrendo diarreia profusa aquosa sem sangue. STB não provoca diarreia pelo mesmo mecanismo. A maioria das infecções causadas por ETEC possui CFA e ambas as enterotoxinas LT e ST. O período de incubação da doença é de 1 a 3 dias, podendo ser tão reduzido como 10 a 12 horas sendo a duração superior a 5 dias (WHO, 2008). É devida à ingestão de 10^6 - 10^8 células (ICMSF, 1996). Os sintomas incluem diarreia (de ligeira a severa), dores abdominais, vómitos e, por vezes, desidratação (WHO, 2008). É a maior causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento e, tal como para EPEC, representa 25% das infecções que afectam crianças e jovens. É também a principal causa de “diarreia do viajante” nestes países (ICMSF, 1996; WHO, 2008). A frequência de casos fatais, nos países industrializados, é inferior a 0,1% (WHO, 2008).

1.2.8.3 *Escherichia coli* Enteroinvasiva

Os principais serótipos responsáveis pelas infecções são O28ac, O29, O112, O124 (o de maior relevância), O136, O143, O144, O152, O164 e O167 (Jay *et al.*, 2005).

Apresentam semelhanças relativamente a *Shigella* spp. nos seguintes aspectos: patogenicidade, actividade bioquímica e antigenicamente. Contudo, são atípicas noutros parâmetros como sejam: lenta ou nula fermentação da lactose e ausência de flagelos. Outras características são o facto de serem descarboxilase-negativa e, geralmente, não produzirem enterotoxinas (Jay *et al.*, 2005).

EIEC causa doença inflamatória da mucosa e submucosa devido à invasão e multiplicação das células epiteliais do cólon (WHO, 2008). A dose infecciosa necessária para desencadear a doença é reduzida, isto é, de apenas 10 células. Ocorre entre 1 a 3 dias após o consumo de alimentos ou água contaminados pela bactéria, ou num período tão reduzido como 10 a 18 horas (WHO, 2008). Os sintomas são semelhantes aos de disenteria bacilar, e consistem em febre, dores abdominais severas, vómitos e diarreia aquosa (em menos de 10% dos casos as fezes podem ser apresentar sangue e muco) (McLauchlin e Little, 2007; WHO, 2008). As estirpes EIEC causam, ocasionalmente, Síndrome Hemolítico Urémico (SHU) em crianças (McLauchlin e Little, 2007). Tal como para EPEC e ETEC

Introdução

também a percentagem de casos fatais, nos países em desenvolvimento, é inferior a 0,1% (WHO, 2008).

1.2.8.4 *Escherichia coli* Enterohemorrágica

A estirpe representativa deste grupo é a *E. coli* O157:H7. O seu reservatório natural é o tracto gastrointestinal dos animais podendo ser excretada nas suas fezes em elevada quantidade.

EHEC provoca lesões de aderência, designadas "*attaching and effacing*" (A/E), semelhantes às da infecção por EPEC (ICMSF, 1996). Contudo, distinguem-se pela produção de elevada quantidade de toxinas citotóxicas, a Verotoxina 1 (VT1) e a Verotoxina 2 (VT2) (e, por isso, são também designadas por produtoras de verocitotoxina, isto é, VTEC) e, por afectarem apenas o intestino grosso (cólon) (ICMSF, 1996). Na sua actividade biológica, citotoxicidade às células HeLa e enterotoxicidade, estas toxinas são semelhantes às produzidas por *S. dysenteriae*. VT1 e VT2 são estrutural e imunologicamente indistinguíveis das toxinas Shiga (ICMSF, 1996) pelo que são designadas por toxinas semelhantes a Shiga 1 (SLT I) e toxina semelhante a Shiga 2 (SLT II), respectivamente (designadas também por STEC). VT1 é, possivelmente, neutralizada por compostos anti-toxina Shiga mas o mesmo não se verifica para VT2 (ICMSF, 1996). VT1 é relativamente termoestável e, a 45-70°C durante 60 minutos, mantém a mesma toxicidade, no entanto, a 80°C por 60 minutos ou a 85°C por 5 minutos, é completamente inactivada.

O crescimento ocorre para temperaturas compreendidas entre 8 °C e 44-45 °C com óptimo a 37 °C e, não é resistente ao tratamento térmico (D a 57-64 °C é de 270 a 9,6 segundos) (McLauchlin e Little, 2007). O crescimento ocorre lentamente a 6,5% de NaCl mas não 8,5% (ICMSF, 1996).

O modo de transmissão é maioritariamente através do consumo de alimentos tais como carne picada crua ou indevidamente cozinhada e leite cru, originários de animais infectados. Também a contaminação fecal da água e outros alimentos assim como a contaminação cruzada aquando da preparação poderão causar infecção (WHO, 2008). O consumo de uma dose tão reduzida como 10 células é suficiente para causar infecção. Esta possui um período de incubação de 3 a 8 dias ou, em média, 4 dias e a sua duração é de dias a semanas. Os sintomas manifestam-se por dores abdominais, diarreia aquosa que pode desenvolver-se para uma diarreia sangrenta (colite hemorrágica) podendo ocorrer febre e vómitos. As sequelas que poderão ocorrer são: SUH, Anemia Hemolítica, Trombocitopenia e "*Thrombotic thrombocytopenic purpura*". Estas contribuem para a significativa morbidade e mortalidade associadas a este patogénico. A proporção de casos fatais é, aproximadamente, de 2% (WHO, 2008).

Introdução

Quadro 3. Resumo dos sinais e sintomas das doenças provocadas por *E. coli* (adaptado de WHO, 2008)

<i>E. coli</i> patogénicas	Período de Incubação	Duração da doença	Sintomas
EPEC	1 a 6 dias (12 a 36 horas)	Dias a semanas	Vómitos, diarreia, dores abdominais e febre.
ETEC	1 a 3 dias (10 a 12 horas)	> 5 dias	Diarreia (de ligeira a severa), dores abdominais e vómitos e, por vezes, desidratação.
EIEC	1 a 3 dias (10 a 18 horas)	Dias a semanas	Febre, dores abdominais severas, vómitos e diarreia aquosa.
EHEC	3 a 8 dias (4 dias)	Dias a semanas	Dores abdominais, diarreia aquosa que pode evoluir para diarreia sangrenta (colite hemorrágica). Podem ocorrer febre e vómitos.

1.2.9 *Campylobacter* spp.

As bactérias do género *Campylobacter* são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou microaerófilos (crescem melhor a níveis reduzidos de oxigénio em presença de dióxido de carbono). Morfologicamente apresentam a forma curva ou em espiral e são móveis por meio de cílios polares (semelhantes ao *Vibrio* spp.) (WHO, 2008). Diferem de *Vibrio* spp. nas características metabólicas pois reduzem o nitrato sendo incapazes de oxidar ou fermentar os hidratos de carbono (ICMSF, 1996; Vierling e Leyral, 2007).

Existem quinze espécies ou subespécies e oito delas prevalecem em seres humanos. O tracto intestinal de vários animais selvagens e domésticos de sangue quente podem conter *Campylobacter* sem evidências da doença (ICMSF, 1996) estando *C. jejuni* presente em aves (frequentemente nas matérias fecais) e *C. coli* em animais domésticos (Vierling e Leyral, 2007). O principal modo de transmissão deve-se à ingestão de alimentos contaminados tais como o leite cru (veículo mais frequente de infecções por *C. jejuni*) e carnes vermelhas e de aves cruas ou indevidamente cozinhadas. Os dados da EFSA (2007) relativos ao ano de 2006 indicam que o frango e outras carnes de aves são importantes fontes de infecção. Pode igualmente referir-se a contaminação cruzada ou contaminação com águas não tratadas e o contacto com animais (ICMSF, 1996; Vierling e Leyral, 2007; WHO, 2008).

O crescimento exige determinadas características: a composição gasosa benéfica é de 5-6% de oxigénio e 10% de dióxido de carbono; em microaerofilia, as temperaturas limite são de 32 °C e 45 °C e, óptimas para 42-43 °C; pH compreendido entre 4,9 e 9,0 cujo óptimo ocorre entre 6,5 e 7,5; a_w superior a 0,987, crescendo melhor a 0,997; concentração

Introdução

de NaCl óptima de 0.5% sendo o limite superior de 1.5%; (ICMS, 1996). *C. jejuni* e *C. coli* possuem necessidades nutricionais de crescimento bastante simples. No alimento sobrevivem a 4 °C mas não ocorre multiplicação, contrariamente a outras espécies enteropatogénicas (Vierling e Leyral, 2007). As estirpes, quanto à sensibilidade térmica diferem, pelo menos, por um factor de 3 (ICMSF, 1996) e, *C. jejuni* é relativamente sensível ao tratamento térmico dado que D_{55} varia de 0,6 a 2,3 minutos. A máxima resistência térmica verifica-se a pH próximo de 7,0 e diminui à medida que este se afasta da neutralidade (ICMSF, 1996; WHO, 2008).

A doença alimentar é designada por Campilobacteriose e, segundo a EFSA (2007), os agentes etiológicos reportados nos mais recentes anos foi *C. jejuni* seguida de *C. coli*. Apesar da baixa redução dos casos observados em 2006 relativamente a 2005, a campilobacteriose continua a ser a doença mais frequentemente reportada na EU, com 175,561 casos confirmados reportados em 2006 por 21 estados-membros e, a incidência foi de 46,1 por 100,000 habitantes. *Campylobacter* foi o agente responsável por 6,9% de todos os surtos reportados, envolvendo 1,302 indivíduos, dos quais 5% foram hospitalizados (EFSA, 2007).

A dose infecciosa é reduzida, 400 a 500 células (Marriott e Gravani, 2006; Vierling e Leyral, 2007). A acção patogénica pode ser exercida ao longo de todo o tubo digestivo, no entanto, a incidência da infecção verifica-se no tracto intestinal, ao nível do jejuno e cólon (ICMSF, 1996; Vierling e Leyral, 2007). Inicia-se por aderência à mucosa da região proximal do intestino delgado, segue-se a produção de uma enterotoxina termolábil (justificando uma diarreia aquosa). Progredir para invasão e inflamação cólon-rectal (responsável por diarreia sanguinolenta e com células inflamatórias) (ICMSF, 1996; Marriott e Gravani, 2006). Deste modo, ocorrem lesões do jejuno e edema da mucosa, hiperemia e ulceração do cólon (ICMSF, 1996). Em casos excepcionais, é possível a sua passagem para a corrente sanguínea (Vierling e Leyral, 2007). Clinicamente assemelha-se a *Salmonella* spp. e a *Shigella* spp. mas a gravidade é inferior (Vierling e Leyral, 2007). O período de incubação é, tipicamente, de 2 a 5 dias mas pode variar de 1 a 11 dias (ICMSF, 1996; Marriott e Gravani, 2006; WHO, 2008) e, posteriormente, surgem os sintomas que variam de acordo com a gravidade da doença. Na forma ligeira, os sintomas podem não se manifestar, contudo, pode ocorrer excreção da bactéria nas fezes. Em casos de maior severidade, os sintomas consistem em febre, diarreia (profusa, aquosa e frequente ou alternativamente sangrenta), dores abdominais e, por vezes, e vómitos (*C. jejuni* e *C. coli*) (Hui *et al.*, 2001; Marriott e Gravani, 2006). A desidratação é, normalmente, o único problema em jovens e idosos (ICMSF, 1996). Podem verificar-se complicações e sequelas como sejam: reincidência (5 a 10%), bacteriemia (raramente), meningite, apendicite aguda, infecções do tracto urinário, endocardite, peritonite, Síndrome de Reiter's e Síndrome de Guillain-Barre (*C. jejuni*) (Hui *et*

Introdução

al., 2001; Marriott e Gravani, 2006). A doença pode permanecer por um período superior a 10 dias e, apesar da possível recuperação, a bactéria poder ser excretada durante 2 a 3 semanas (ICMSF, 1996; Marriott e Gravani, 2006; WHO, 2008). Os casos fatais nos países industrializados é de cerca de 0,05% e as crianças são o grupo etário mais susceptível (WHO, 2008).

1.2.10 *Vibrio* spp.

1.2.10.1. *Vibrio cholerae*

V. cholerae é a principal espécie do género *Vibrio*. É um bacilo de forma curva, Gram-negativo, oxidase-positivo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, móvel por meio de um flagelo polar (ICMSF, 1996; WHO, 2008).

O habitat do género *Vibrio* é o meio aquático pelo que sobrevive em águas doces e salgadas e, as estirpes patogénicas estão aí presentes por longos períodos de tempo (McLauchlin e Little, 2007).

É uma bactéria mesófila, medianamente halotolerante, sensível à temperatura, acidez e a_w reduzido (ICMSF, 1996). As características necessárias para que o crescimento ocorre são as seguintes: temperaturas compreendidas entre 18 °C e 42 °C sendo o óptimo de 37 °C (o tratamento térmico letal ocorre para temperaturas superiores a 48 °C); o pH deve ser compreendido entre 6,0 e 11,0 sendo o óptimo de 7,6; o intervalo para a_w deve ser compreendido entre 0,970 e 0,998 sendo o valor óptimo de 0,984; é estimulado por níveis de salinidade de cerca de 3% mas é inibido a 6% (ICMSF, 1996; WHO, 2008). Caso as condições não favoreçam o crescimento, *V. cholerae* apresenta-se sob uma forma metabolicamente inactiva (McLauchlin e Little, 2007).

A infecção humana ocorre pelo consumo de alimentos e água (principal via de transmissão) cuja contaminação é de origem fecal ou por manipuladores infectados. Os alimentos respeitam a produtos vegetais cultivados em águas não tratadas, alimentos manuseados sem posterior processamento e, por consumo de peixe e marisco crus ou indevidamente cozinhados (McLauchlin e Little, 2007; WHO, 2008).

A doença é designada por Cólera e as estirpes *V. cholerae* são responsáveis são O1 e O139 e a sua patogenicidade é devida a uma toxina e a um factor de colonização (McLauchlin e Little, 2007; WHO, 2008). As estirpes *V. cholerae* não-epidémica, *V. cholerae* “non-O1” ou *V. cholerae* “non-O139” podem causar uma doença semelhante, de menor severidade, pois não produzem uma verdadeira toxina cólera (ICMSF, 1996; McLauchlin e Little, 2007). *V. cholerae* O1 resiste à acidez do estômago e adere às células da mucosa no intestino delgado, produzindo uma enterotoxina, cólera, resultando na secreção de água e electrólitos no lúmen intestinal (ICMSF, 1996; McLauchlin e Little, 2007). Estirpes *V. cholerae* “non-O1” podem ser ou não toxigénicas e, normalmente, causam sintomas mais

Introdução

ligeiros, contudo, possuem outros mecanismos, enterotoxina LT (termolábil) e ST (termoestável), citotoxinas semelhantes a Shiga e, podem ser produzidas adesinas e mucinase (ICMSF, 1996).

A cólera possui um período de incubação de 1 a 3 dias após a ingestão de água ou alimentos contaminados por milhares ou milhões de células e, os sintomas iniciam-se por diarreia ligeira, desconforto abdominal e anorexia, progredindo rapidamente com volumosa produção de diarreia aquosa com muco ("*rice water diarrhoea*") e rápida perda de fluidos e sais corporais (especialmente potássio) conduzindo a uma desidratação severa, hipertensão e desequilíbrio salino. A ausência de tratamento pode ser fatal, especialmente em indivíduos mal nutridos mas em indivíduos saudáveis e bem nutridos a recuperação ocorre entre 1 a 6 dias recebendo fluidos e sais (ICMSF, 1996). Relativamente aos distúrbios provocados por *V. cholerae* "non-O1" são caracterizados por dores abdominais e febre, náuseas, vômitos e diarreia sangrenta e, normalmente, a doença resolve-se espontaneamente no espaço de 2 a 21 dias com uma média de 4 a 6 dias (ICMSF, 1996). O organismo pode ser excretado durante várias semanas ou meses após a infecção mas a transmissão secundária é rara (McLauchlin e Little, 2007).

1.2.10.2 *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, móvel por um flagelo polar ou periféricos (ICMSF, 1996; McLauchlin e Little, 2007). As estirpes podem ser diferenciadas em serótipos com base em antígenos O e K mas não existe uma clara correlação entre serologia e patogenicidade (ICMSF, 1996).

O seu habitat natural é relativo a água de regiões costeiras e estuários (McLauchlin e Little, 2007).

O crescimento verifica-se aquando dos seguintes parâmetros: temperatura compreendida entre 5 °C e 43 °C com óptimo a 37 °C; pH de 4,8 a 11,0 sendo mais adequado entre 7,8 e 8,6; o a_w mínimo e de 0,940 e o máximo de 0,996 sendo óptimo para 0,981; as condições de aerobiose são mais favoráveis ao crescimento; e, a concentração óptima de NaCl é de 3% sendo o mínimo e o máximo de 0,5% e de 10% (carácter halófilo), respectivamente (ICMSF, 1996; WHO, 2008). A fermentação da sacarose e a tolerância salina são características que permite distinguir esta bactéria das restantes do género *Vibrio* (ICMSF, 1996).

O principal veículo alimentar da infecção é o marisco cru ou insuficiente cozinhado. *V. parahaemolyticus* causa gastroenterite e, a doença ocorre entre 12 a 24 após o consumo de elevadas quantidades (10^5 - 10^7) de estirpes patogénicas. É descrita como uma forma ligeira de cólera e consiste num rápido aparecimento de diarreia profusa com dores abdominais agudas, ligeira ocorrência de vômitos e febre (McLauchlin e Little, 2007). A

Introdução

duração da doença é superior a 8 dias. A proporção de casos fatais em países industrializados é inferior a 1% (WHO, 2008).

1.2.11 *Yersinia* spp.

O género *Yersinia* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é constituído por bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos (WHO, 2008). Consiste em 11 espécies das quais apenas *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* são patogénicas para seres humanos e animais (ICMSF, 1996). Apenas alguns serótipos são patogénicos para os seres humanos e os mais comuns são 0:3, 0:5,27, 0:8 e 0:9, ocasionalmente 0:13, 0:21 e 0:4,32 e, raramente 0:1, 0:1,2,3, 0:2,3, 0:20 e 0:40.

Para o crescimento *Y. enterocolitica* necessita de condições nutricionais óptimas e temperaturas compreendidas entre 0 °C e 44 °C com óptimo pertencente a 29 °C (WHO, 2008). A temperatura extremamente baixa ou elevada existe uma grande proporção de estirpes que crescem, incluindo estirpes patogénicas. Pode crescer num amplo intervalo de pH, isto é, de 4,6 a 9,0 mas o óptimo ocorre ente 7,0 e 8,0. O inibidor mais efectivo é o ácido acético quando comparado com os ácidos láctico e cítrico. Aparentemente, a combinação de temperaturas de refrigeração (3 °C) e pH baixo ou elevado é eficaz na redução do seu crescimento. A tolerância à concentração salina é moderada e, *Y. enterocolitica* em meio nutritivo com temperaturas favoráveis cresce a 5% de NaCl mas não quando esta é de 7% (WHO, 2008).

O principal reservatório de serótipos patogénicos para os seres humanos é o porco ao nível da cavidade faríngea (ICMSF, 1996; WHO, 2008). As aves são portadoras e podem conduzir à contaminação dos ovos. O solo e a água são fontes importantes de estirpes não adaptadas (Vierling e Leyral, 2007). Os alimentos associados a Yersiniose são as carnes picadas (principalmente porco), produtos lácteos (leite pasteurizado ou em pó e gelados), mexilhão e ostras e, algumas preparações culinárias armazenadas em refrigeração por longos períodos de tempo (Vierling e Leyral, 2007).

A doença é designada por Yersiniose e o seu agente etiológico é a *Y. enterocolitica*. De acordo com a EFSA (2007) não existem dados reportados significativos, do ponto de vista da saúde pública. Foram reportados por 20 estados-membros e dois estados não-membros da UE, 8979 casos confirmados de Yersiniose, em 2006. Estes representam, uma diminuição de 5,8% relativamente aos 9533 casos reportados em 2005. Verificou-se igualmente uma redução na incidência, isto é, de 2,6 para 2,1 por 100,000 habitantes, contudo, quando são considerados os últimos 5 anos, esta diminuição não é significativa. Em Portugal, no mesmo ano, não foram registados quaisquer casos da doença mas, contrariamente, em 2003 e 2004 foram registados 6 e 3 casos, respectivamente. É uma doença de natureza infecciosa e manifesta-se mais frequentemente, sob a forma de

Introdução

gastroenterites febris, em crianças com idades inferiores a 4 anos (32%) e em crianças e adolescente com idades compreendidas entre 5 e 14 anos (20%) (EFSA, 2007). Pode ocorrer em adultos por septicemia e poliartrites. Aparentemente, *Yersinia* apresenta uma distribuição sazonal quase uniforme, com um número de casos reportados ligeiramente superior no verão e nos primeiros meses de Outono (EFSA, 2007). O tempo de incubação varia entre 24 e 36 horas mas pode variar entre 1 e 11 dias e a dura entre 2 a 3 dias podendo permanecer de forma ligeira entre 1 a 3 semanas (WHO, 2008). Os sintomas consistem em diarreia líquida ou pastosa, de odor desagradável, raramente sanguinolentas e dores abdominais. Existem sintomas inconstantes que são dores abdominais profundas, vômitos, náuseas, febre (39-40 °C durante alguns dias e, posteriormente, 38 °C por várias semanas). Raramente ocorre morte dos indivíduos (WHO, 2008).

1.3 Causas da Contaminação e Factores que Influenciam a Multiplicação dos Microrganismos nos Alimentos

Segundo a WHO, “a alimentação deve ser disponível em quantidade e qualidade nutricionalmente adequadas, além de ser livre de contaminações que possam levar ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar” (Mesquita *et al.*, 2006).

A contaminação dos alimentos significa a presença de qualquer elemento estranho à sua natureza e composição podendo ser de natureza biológica, física ou química. A contaminação microbiológica pode ocorrer em diversas fases do processamento alimentar e pode afectar a qualidade e segurança dos alimentos. As fontes de contaminação são: o solo, o ar ambiente, a água e as águas residuais, as matérias-primas, os manipuladores, os equipamentos e utensílios, os insectos e as pragas (Lacasse, 2000; Mesquita, 2006). Deste modo as consequências da contaminação dos alimentos consistem no facto de representarem um risco para a saúde pública (aquando da presença de patogénicos) bem como perdas económicas (Lacasse, 2000). É necessário recorrer à aplicação de medidas de controlo com o objectivo de eliminar ou reduzir a contaminação para níveis aceitáveis, isto é, causar a morte do microrganismo ou apenas danos ou ainda controlar o seu crescimento (dependendo do microrganismo e do produto em causa) (Vierling e Leyral, 2007).

Introdução

Na Figura 1 é apresentado um esquema relativo à origem das contaminações dos alimentos.

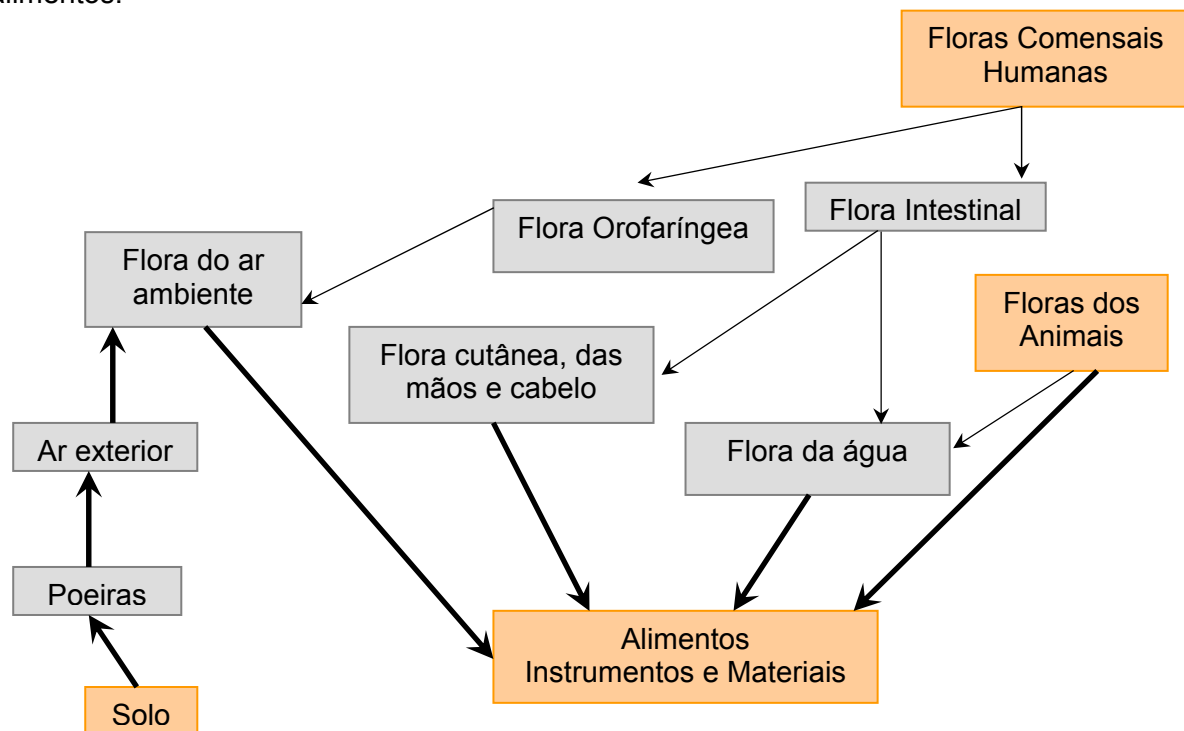


Figura 1 – Esquema resumo da origem das contaminações dos alimentos (adaptado de Joffin e Joffin, 2003)

A sobrevivência e crescimento dos microrganismos são determinados por factores que interagem entre si e que devem ser controlados, de modo a produzir alimentos seguros e estáveis. Tais factores são: a temperatura, a disponibilidade de nutrientes, o potencial de oxidação-redução, a acidez do meio (medida por meio do pH) e a actividade da água (a_w). Quanto à temperatura pode referir-se que à medida que esta diminui, há uma redução na taxa de crescimento do microrganismo e um aumento da respectiva fase de latência e, em alimentos refrigerados (-1 a 8 °C), o tempo de vida útil é superior e o crescimento da flora bacteriana patogénica mesófila (*Salmonella* spp., *Cl. perfringens* e *S. aureus*) é inibido. Contudo, os danos sofridos são reversíveis aquando da exposição à temperatura ambiente. Em congelação o crescimento é inibido em consequência da diminuição do a_w e, abaixo de -5 °C, poucas bactérias crescem, uma reduzida proporção sobrevive e a restante morre (é essencial e necessário que haja água no estado líquido e disponível e, abaixo do mínimo o crescimento cessa podendo, no entanto, sobreviver por longos períodos; os organismos responsáveis por intoxicações não crescerão nos alimentos cujo a_w é inferior a 0,93, excepto *S. aureus*, *B. cereus* e fungos produtores de micotoxinas). Quando o pH é inferior ao limite mínimo (depende da natureza do ácido) a taxa de crescimento diminui, a fase de latência aumenta, a fase estacionária diminui e a taxa de mortalidade aumenta. Para o crescimento

Introdução

bacteriano, salvo algumas exceções, o pH mínimo é de 4,0-4,5, o máximo ocorre entre 8,0 e 9,0 e o óptimo entre 6,8 e 7,2. Para bolores e leveduras, o pH óptimo é de 3,0-3,5 e 4,0-4,5, respectivamente. O potencial de oxidação-redução representa a quantidade de oxigénio presente e, à superfície dos alimentos, pode ocorrer crescimento de microrganismos aeróbios obrigatórios, anaeróbios facultativos ou aeróbios facultativos. Alimentos dos quais o oxigénio foi removido suportam o crescimento de anaeróbios obrigatórios e facultativos. A remoção parcial do oxigénio pode permitir o crescimento de verdadeiros microaerófilos.

Concluindo, na etapa final da produção de um alimento este contém uma microflora que, qualitativa (possível presença de espécies patogénicas) e quantitativamente (provoca alterações no alimento diminuindo o seu tempo de vida útil), resulta de sucessivas contaminações. São importantes fontes de contaminação as matérias-primas, os manipuladores, os equipamentos e utensílios, o solo, a água e o ar ambiente, as águas residuais, insectos e pragas (Lacasse, 2000).

1.3.1 Matérias-primas

A via alimentar é uma das fontes de contaminação de maior viabilidade. Pode ocorrer aquando da utilização de ingredientes contaminados em refeições preparadas incorrectamente por contaminação cruzada, especialmente, entre alimentos crus e cozinhados (Lacasse, 2000). É também devida ao tratamento térmico inadequado ou à sua não aplicação, arrefecimento incorrecto e reutilização inadequada de sobras alimentares (Mesquita, 2006).

São relativamente importantes as carnes vermelhas e de aves e seus derivados, ovos e ovoprodutos, lacticínios, marisco, frutos e vegetais (McLachlin e Little, 2006).

O leite é um reservatório de perigos microbianos e as principais fontes de contaminações são: animais com mastites, o úbere, os equipamentos, o transporte e armazenamento e o processamento; a presença de potenciais patogénicos deve-se à inadequada pasteurização, à sua não ocorrência ou a posterior contaminação (McLauchlin e Little, 2007).

A contaminação das carnes vermelhas e de aves pode ser de origem interna – microflora intestinal e por outros órgãos (fígado, rins, nódulos linfáticos e baço) – e/ou externa – contaminação cruzada entre alimentos e superfícies e entre alimentos crus e cozinhados (McLachlin e Little, 2007), manipuladores, equipamentos e utensílios utilizados no processamento (Marriott e Gravani, 2006; McLachlin e Little, 2007).

Os ovos podem ser contaminados por transmissão transovárica durante a sua formação e, no ambiente exterior, durante o armazenamento, embalamento, processamento, distribuição e preparação.

Introdução

O marisco está sujeito a elevado manuseamento desde a captura ao consumo, sendo a contaminação superior nas etapas iniciais; a contaminação posterior ao processamento pode ser devida a patogénicos como *L. monocytogenes* (peixe e marisco fumado), esporos de *Cl. perfringens* (McLauchlin e Little, 2007); o armazenamento ocorre, frequentemente, por longos períodos de tempo na ausência de refrigeração prévia, favorecendo a contaminação e o crescimento dos microrganismos (Marriott e Gravani, 2006).

A principal fonte de contaminação dos produtos vegetais é o solo e a água e, os microrganismos responsáveis são bactérias lácticas e algumas leveduras assim como as bactérias patogénicas (*Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*) e vários géneros de bolores (Marriott e Gravani, 2006).

1.3.2 Manipuladores

Os manipuladores são a principal fonte de contaminação de alimentos e, do ponto de vista da saúde pública, são a principal fonte de toxinfecções bacterianas alimentares. Isto deve-se ao contacto com os géneros alimentícios, componentes do ambiente de produção (solo, água e resíduos) e, depende directamente do nível de higiene e do comportamento adoptado em todas as etapas do processamento alimentar (Lacasse, 2000; Marriott e Gravani, 2006).

Os manipuladores podem ser portadores de microrganismos patogénicos que podem propagar-se aos alimentos que manuseiam por serem: temporariamente afectado por doença contagiosa, gastroenterite ou feridas infectadas; portadores assintomáticos de patogénicos (*S. aureus* na flora nasal ou *Salmonella* na flora intestinal); vectores de agentes patogénicos (as mãos veiculam, frequentemente, *Salmonella* e *E. coli*) (Lacasse, 2000; Marriott e Gravani, 2006). Este tipo de contaminação ocorre nas etapas de processamento, embalagem, preparação e serviço, por contacto directo, respiração, tosse e espirros.

1.3.3 Equipamentos e Utensílios

A contaminação dos equipamentos e utensílios deve-se às matérias-primas e aos manipuladores ocorrendo durante todas as etapas do processamento. Os microrganismos aderem facilmente às superfícies dos equipamentos e utensílios (máquinas e acessórios, facas, tábuas para corte, recipientes) quando nestes se verifica a acumulação de partículas de resíduos alimentares; representam excelentes meios à multiplicação microbiana. Deste modo, o contacto dos alimentos com superfícies indevidamente higienizadas aumenta, consideravelmente, a sua carga microbiana (Trachoo, 2003). Neste sentido os biofilmes são de extrema importância pois consistem em ecossistemas microbianos complexos, estruturados e dinâmicos, nos quais as populações bacterianas aderem entre si e/ou a

Introdução

superfícies ou interfaces, colonizam e crescem (nem todos os microrganismos constituintes o fazem de modo activo) (Trachoo, 2003). Originam microcolónias e sintetizam uma matriz exopolissacarídica (EPS) que actua como um substrato para a aderência de microrganismos (Trachoo, 2003). A aderência das bactérias à superfície é afectada pela disponibilidade e concentração de nutrientes, pH, temperatura, concentração de electrólitos, fluxo de materiais (Trachoo, 2003) e pelas propriedades físico-químicas das superfícies, pelo que os factores que condicionam o seu crescimento são: a desidratação, temperaturas elevadas e reduzidas e os agentes antimicrobianos. EPS actua ainda como uma barreira física fazendo com que os biofilmes sejam cerca de 500 vezes mais resistentes aos compostos antimicrobianos, no entanto, estes apesar de poderem penetrar nos biofilmes não o fazem de modo efectivo pois não atingem as células presentes em aglomerados ou microcolónias (Trachoo, 2003).

Nos ambientes de processamento alimentar prevalência de biofilmes é elevada podendo estar presentes em todos os tipos de superfícies, desde plásticos, metais, madeiras e produtos alimentares. São de difícil remoção e a inactivação das bactérias por métodos convencionais é ineficiente. São constituídos por microrganismos patogénicos e degradantes comprometendo os parâmetros de segurança e higiene das instalações podendo originar toxinfecções alimentares. Neste sentido, são especialmente importantes em alimentos crus e minimamente processados (Trachoo, 2003).

De um modo geral, todos os equipamentos e utensílios devem ser submetidos a limpeza e desinfecção (Lacasse, 2000). A concepção dos locais e dos equipamentos é igualmente importante: os revestimentos das paredes e dos pisos devem ser lisos; as áreas de trabalho devem ser lisas, impermeáveis e de fácil manutenção. Devem evitar-se materiais porosos pois é impossível extrair os microrganismos (Lacasse, 2000).

1.3.4 Solo, Água e Ar

Estes constituintes ambientais estão intimamente relacionados pois os microrganismos presentes no solo, por acção do vento, podem ser disseminados para a atmosfera e, posteriormente, contaminar linhas de água.

A microflora do solo e da água possuem determinadas características comuns. A microflora do solo varia consoante as condições climáticas, o teor de matéria orgânica e a fertilização por matérias fecais. Os climas quentes favorecem os microrganismos de alteração enquanto os frios e secos favorecem formas de resistência, como sejam as bactérias esporuladas (*Clostridium* e *Bacillus*, bolores e leveduras). Devido ao teor de matéria orgânica e à fertilização por matérias fecais podem estar presentes microrganismos de origem entérica (coliformes, *Salmonella* spp., enterococos e outros). De modo geral, a microflora do solo consiste em bactérias (maioria) – *Actinomicetas*, *Pseudomonas*,

Introdução

Arthrobacter, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Bacillus* e *Micrococcus* – e fungos – *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizoctonia* (Vierling e Leyral, 2007).

A flora microbiana da água pode ser de duas origens: puramente hídrica, na qual estão presentes microrganismos de alteração, muitos dos quais psicrófilos (*Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Bacillus* e *Micrococcus*); ou, proveniente do solo, ar, actividades agrícolas e águas residuais (as últimas podem conter microrganismos entéricos). A água utilizada para irrigação e tratamento de produtos alimentares, adicionada aos alimentos, utilizada directamente para consumo, assim como para a lavagem de equipamentos e utensílios, deve ser de muito boa qualidade pois aquelas que não sejam submetidas a qualquer tipo de tratamento podem estar contaminadas por microrganismos de origem fecal (Lacasse, 2000).

O ar, pela ausência de alimento e falta de humidade, não possui uma microflora específica. Os microrganismos são provenientes do solo, matérias em decomposição ou vegetação, dos microrganismos fixados em poeiras e da pulverização de estrumes líquidos (microrganismos entéricos e patogénicos). A elevada resistência à dessecação justifica a predominância de Gram-positivos e bolores e, a raridade de bacilos Gram-negativos (Vierling e Leyral, 2007). É importante controlar a qualidade microbiológica do ambiente nos locais de produção, embalagem, armazenamento e preparação de alimentos devido à possibilidade de exposição dos alimentos (Lacasse, 2000). Os métodos mais eficientes na redução desta contaminação são: a aplicação de práticas sanitárias adequadas, a filtração do ar à entrada das áreas de preparação e processamento dos alimentos e a protecção dos produtos através de técnicas e materiais de embalagem adequados.

1.3.5 Águas Residuais

As águas residuais, caso não sejam submetidas a tratamento, contêm microrganismos patogénicos, de origem humana, animal e ambiental. O tracto gastrointestinal é uma importante fonte de contaminação, pois a sua microflora pode contaminar linhas de água posteriormente utilizadas na lavagem de produtos alimentares (*Salmonella*, *Enterobacteriaceae* e patogénicos de origem fecal) (Marriott e Gravani, 2006). Caso a drenagem destes fluidos tenha como destino linhas de água potável, lagos, rios e baías oceânicas, ocorre a sua contaminação assim como dos organismos que aí naturalmente habitam (peixes e marisco) (Lacasse, 2000). A microflora consiste em enterobactérias, enterococos, *Clostridium* spp e, possivelmente, *Salmonella* spp. e enterovírus (Vierling e Leyral, 2007).

Introdução

Na prevenção desta contaminação: deve separar-se, adequadamente, águas residuais e fontes hídricas adequadas; as águas residuais puras não devem ser aplicadas a campos de cultivo de frutas e legumes.

1.3.6 Pragas

As pragas são representadas por insectos e roedores (ratos, baratas, moscas, mosquitos, etc.) os quais são portadores de inúmeros microrganismos prejudiciais à saúde. Estão associadas a ambientes de processamento de alimentos e resíduos. Transferem substâncias indesejadas de diversas áreas ou embalagens (cartão e madeira) contaminadas para os alimentos. O acesso é favorecido pelo sistema de saneamento, orifícios em paredes, pavimentos e janelas não protegidas. A prevenção da contaminação é efectuada através de medidas de erradicação de pragas e protecção das áreas de preparação, processamento e serviço de alimentos.

1.4 Critérios Microbiológicos

O estabelecimento e aplicação de critérios microbiológicos aos alimentos são da responsabilidade da Comissão Europeia, da WHO, da *Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) e do *Codex Alimentarius Commission* (CAC). De acordo com CAC um critério microbiológico alimentar “define a aceitabilidade de um produto ou lote, baseado na presença ou ausência, ou número de microrganismos incluindo parasitas e/ou quantidade das suas toxinas/metabolitos, por unidade (s) de massa, volume, área ou lote” (McLauchlin e Little, 2007). O propósito da aplicação de critérios microbiológicos consiste na protecção da saúde do consumidor, através do fornecimento de alimentos seguros e saudáveis. Assim, são linhas de orientações relativas à aceitabilidade dos géneros alimentícios e das etapas de produção. A eles se recorre para validação dos procedimentos do sistema “*Hazard Analysis and Critical Control Points*” (HACCP) e outras medidas de controlo de higiene, a interpretação de resultados de testes microbiológicos a fim de gerir e monitorizar a segurança dos alimentos (McLauchlin e Little, 2007). Os critérios microbiológicos devem ser de aplicação prática e, apenas onde sejam necessários. Os microrganismos incluídos nos critérios devem ser patogénicos relevantes ou organismos indicadores para um alimento ou tecnologia particular (McLauchlin e Little, 2007). De acordo com o CAC o estabelecimento de critérios deve considerar: evidências de actuais ou potenciais perigos para a saúde; microbiologia das matérias-primas; o efeito do processamento; a probabilidade e consequências da contaminação e crescimento durante o manuseamento, armazenamento e utilização; a categoria do consumidor de risco; a razão custo-benefício da aplicação; e, a utilização pretendida do alimento. Estão directamente

Introdução

relacionados com o perigo ou, ainda, a outros organismos (caso estejam presentes) associados à presença do perigo (organismos indicadores) (McLauchlin e Little, 2007).

Existem dois tipos de critérios microbiológicos: critérios de segurança alimentar; critérios de higiene dos processos. Os primeiros definem a aceitabilidade de um produto ou lote e, são aplicados a eles aplicados na etapa final do processamento; o não cumprimento requer notificação às autoridades competentes. (*Salmonella* e *L. monocytogenes* são os mais relevantes). Os últimos definem a aceitabilidade de um processo e, incluem critérios para organismos patogénicos e indicadores e, são aplicados apenas durante o processamento, para géneros alimentícios como carne, leite, ovos, peixe e marisco, frutos e vegetais e seus subprodutos (Forsythe, 2005; McLauchlin e Little, 2007).

Os critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios na União Europeia foram harmonizados em legislação comunitária pelo Regulamento (CE) n.º 2073/2005. A Regulamentação procura a modernização e revisão dos critérios existentes, baseando-se nos mais recentes conhecimentos científicos e em princípios internacionais. Considera também novos perigos microbiológicos, desenvolvimentos na tecnologia alimentar e métodos de análise. A Regulamentação é aplicada a todas as empresas do sector alimentar envolvidas na produção e manipulação de alimentos e, a verificação do seu cumprimento é da responsabilidade das autoridades competentes (Forsythe, 2005; McLauchlin e Little, 2007).

No âmbito deste trabalho, para a avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos, os resultados analíticos foram interpretados com recurso aos “critérios microbiológicos” propostos pelo INSA, ou seja os Valores Guia. Estes constituem linhas de orientação e são úteis para a identificação de situações que requerem monitorização, com o objectivo de garantir o cumprimento das Boas Práticas de Fabrico.

1.4.1 Indicadores e índices microbiológicos

Os agentes microbiológicos podem ser utilizados como índices e como indicadores. A aplicação dos primeiros baseia-se na detecção ou presença de microrganismos e, supõem ou implicam a potencial presença de patogénicos relacionados taxonómica, fisiológica e ecologicamente. Os últimos, em números predeterminados, sugerem deficiência dos processos de higienização, saneamento segurança ou inocuidade do alimento (Mossel *et al.*, 2003). Isto é, reflectem a qualidade microbiológica do alimento e, quando presentes num determinado género alimentício a níveis específicos, indicam o seu estado de segurança e o seu tempo de vida útil (Hui *et al.*, 2001; Jay *et al.*, 2005).

De seguida far-se-á a descrição dos principais indicadores microbiológicos utilizados.

Introdução

1.4.1.1 Microrganismos aeróbios mesófilos totais

O objectivo desta contagem é determinar a carga microbiológica *aeróbia, mesófila* (com temperatura óptima de crescimento entre 25° C e 40°C) e *viável* no produto a analisar. Neste ensaio determina-se a presença de bactérias, bolores e leveduras, englobando em simultâneo agentes responsáveis por alterações dos produtos e microrganismos patogénicos.

Esta determinação tem um significado importante em microbiologia alimentar por ser o melhor método de avaliar a qualidade microbiológica geral dos alimentos. É um exame com particular importância no controlo industrial, porque fornece informação útil com base num método rápido e fácil de realizar. Embora a informação que resulta desta técnica não garanta a segurança sanitária dos produtos (para isso é necessária a pesquisa de organismos patogénicos), a sua aplicação está generalizada, pois uma flora muito numerosa pode tornar o alimento impróprio para consumo (diminui a nutritividade e pode conduzir à formação de produtos tóxicos, como a histamina).

1.4.1.2 Coliformes totais

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que produzem ácido a partir da glucose e outros hidratos de carbono. Dentro desta encontramos um grupo de organismos, os *coliformes* (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*), que se caracteriza pela sua capacidade de crescer em meio que contém sais biliares e, possui a capacidade de fermentar a lactose, com produção de gás (critério utilizado na sua identificação) (Alves, 2002; Forsythe, 2002; Mossel *et al.*, 2003). São capazes de se multiplicar numa grande diversidade de substratos, a temperaturas compreendidas entre -2 °C e 50 °C e a pH entre 4,4 e 9,0.

Os coliformes não fazem parte da flora normal da maioria dos alimentos e, o seu habitat natural é o intestino do Homem e de animais de sangue quente. Por isso, é considerado um bom índice de contaminação fecal. Contudo, por serem abundantes nos meios aquático e telúrico a contaminação nem sempre é de origem fecal. Deste modo, a sua presença nos alimentos traduz uma contaminação indesejável, possivelmente de origem fecal, e um risco da presença de germes patogénicos intestinais. É aplicado a alimentos manipulados após o tratamento e/ou em manutenção na cadeia de frio.

Quando existem em número elevado, podem provocar toxinfecções alimentares. Contudo, um número reduzido de coliformes viáveis não significa a perfeita segurança do alimento, pois as espécies patogénicas mais resistentes podem estar presentes e não ser detectadas, ou ocorrer inactivação dos seus metabolitos tóxicos (Lacasse, 2000).

É uma boa técnica de controlo da qualidade higiénica dos alimentos devido à elevada abundância destas bactérias nas matérias fecais, pela sua sobrevivência em

Introdução

ambientes similares ao de outros patogénicos intestinais e por ser um método rápido e fácil de realizar.

As limitações como indicadores de segurança alimentar podem ser superadas por testes adicionais, como a pesquisa de coliformes fecais e de *Salmonella* spp (Lacasse, 2000).

1.4.1.3 Coliformes fecais

Os coliformes fecais são coliformes que fermentam a lactose com produção de gás, num período de 48 horas a 45,5 °C (Alves, 2002; Forsythe, 2002) e, tal como os coliformes totais, possuem a capacidade de multiplicar-se em alguns alimentos e resíduos alimentares. São principalmente representados por *E. coli*, estirpes *Enterobacter* e *Klebsiella*.

É um indicador de contaminação de origem fecal de maior precisão e indica a presença de patogénicos. Uma contagem elevada indica falta de higiene e origina suspeita quanto à sua inocuidade, contudo, a presença de patogénicos de origem entérica não é, necessariamente, certa.

E. coli é o melhor índice de contaminação fecal e, o facto de a sua destruição ocorrer aquando dos patogénicos bacterianos fecais, favorece a sua utilização. Contudo, alguns patogénicos podem apresentar resistência superior na água, persistindo em águas tratadas e, do mesmo modo, permanecer em alimentos submetidos aos tratamentos de congelação, refrigeração ou irradiação após a destruição de *E. coli*. A sua relativa resistência a reduzido pH torna-o um indicador especialmente útil em alimentos ácidos. É a única espécie que indica a presença de *Salmonella* (Lacasse, 2000).

1.4.1.4 *Salmonella* spp.

A presença de *Salmonella* spp. nos alimentos significa reduzida qualidade higio-sanitária devido a práticas de higiene insuficientes na manipulação de alimentos; matérias-primas de origem animal contaminadas; controlo inadequado da temperatura; contaminação cruzada; presença de bactérias responsáveis por intoxicações alimentares devido a contaminação de origem animal pós-sanitização.

1.4.1.5. *Staphylococcus* spp.

S. aureus é um indicador de salubridade para alimentos muito manipulados (Lacasse, 2000) e confeccionados. Quando presente nos alimentos, pode indicar matérias-primas de origem animal contaminadas ou de contaminação secundária com origem nos manipuladores (vias orais e nasais), equipamentos e utensílios inadequadamente higienizados. Uma contagem elevada geralmente indica fraca higiene pessoal, higienização dos alimentos imprópria e prolongada permanência dos alimentos à temperatura ambiente

Introdução

(Lacasse, 2000). A pesquisa de estafilococos coagulase-positiva é efectuada para avaliação da produção de toxinas de elevada estabilidade térmica.

A presença deste indicador suscita incerteza quanto à inocuidade dos produtos, tanto mais grave quanto maior for a resistência térmica das toxinas (Lacasse, 2000).

1.4.1.7 *Listeria monocytogenes*

É um indicador de higiene e avalia todas as etapas do processamento alimentar, especialmente a cadeia de frio. A sua aplicação a alimentos como o leite cru, queijos de pasta mole, produtos cárneos e saladas justifica-se pela sua natureza ubíqua, pelo reduzido grau de processamento, elevada manipulação dos alimentos e capacidade de aderir e sobreviver em várias superfícies de contacto. Indica também a ocorrência de contaminação cruzada com os equipamentos e utensílios no ambiente de processamento de produtos.

1.4.1.8 Bolores e Leveduras

Os bolores e as leveduras estão presentes no meio ambiente. Podem fazer parte da flora normal dos alimentos ou causar a sua alteração. Podem desenvolver-se em alimentos ácidos, de a_w reduzido e a temperaturas reduzidas.

A contagem de bolores e leveduras indica as condições gerais de higiene no processamento dos alimentos, durante o seu armazenamento e transporte (contaminação após o processamento), ineficácia do tratamento de pasteurização ou, no caso de matérias-primas, a sua qualidade higiénica. Podem ser considerados indicadores de contaminação ambiental devido à presença dos esporos no ambiente de processamento alimentar.

Algumas espécies podem crescer e produzir micotoxinas em alimentos processados devido à resistência: ao tratamento térmico, ao congelamento, a alguns antibióticos e à irradiação. Um crescimento significativo de bolores e leveduras pode indicar a produção de micotoxinas (Lacasse, 2000).

1.5 Mecanismos de Segurança Alimentar em Restauração

1.5.1 Legislação

O Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios, conforme o disposto no Capítulo I, *Artigo 1º*, Ponto 1, alínea e), considera que “os códigos de boas práticas constituem um instrumento valioso para auxiliar os operadores das empresas dos sector alimentar, a todos os níveis da cadeia alimentar, na observância das regras de higiene e dos princípios HACCP”. O Capítulo II, *Artigo 3º* define, como obrigação geral, que os operadores das empresas do sector alimentar assegurem que todas as fases da produção, transformação e distribuição de géneros alimentícios sob o seu controlo satisfaçam os requisitos pertinentes

Introdução

em matéria de higiene estabelecidos no presente regulamento. Os operadores do sector alimentar que se dediquem a qualquer uma das fases referidas, segundo o Capítulo II, *Artigo 4º*, Ponto 2, devem cumprir os requisitos gerais de higiene previstos no anexo II e em quaisquer outras disposições específicas previstas no mesmo regulamento. O Capítulo I, Ponto 9 deste anexo refere que os manipuladores devem, sempre que necessário, dispor de vestiário adequado. Os indivíduos devem respeitar requisitos de higiene os quais são especificados no Capítulo III do referido anexo sendo que o Ponto 1 menciona que “qualquer pessoa que trabalhe num local em que sejam manuseados alimentos deve manter um elevado grau de higiene pessoal e deverá usar vestuário adequado, limpo e, sempre que necessário, confira protecção”; já o Ponto 2 estabelece que “qualquer pessoa que sofra ou seja portadora de uma doença facilmente transmissível através dos alimentos ou que esteja afectada, por exemplo, por feridas infectadas, infecções cutâneas, inflamações ou diarreia será proibida de manipular géneros alimentícios e entrar em locais onde se manuseiem alimentos, seja a que título for, se houver probabilidade de contaminação, directa ou indirecta. Qualquer pessoa afectada deste modo e empregada no sector alimentar e que possa entrar em contacto com géneros alimentícios deverá informar imediatamente o operador do sector alimentar de tal doença ou sintomas e, se possível, das suas causas”. O Capítulo XII, Ponto 1 daquele anexo menciona que “o pessoal que manuseia os alimentos seja supervisionado e disponha, em matéria de higiene dos géneros alimentícios, de instrução e/ou formação adequadas para o desempenho das suas funções”; e, segundo o Ponto 2 “os responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção dos processos baseados nos princípios HACCP ou pela aplicação das orientações pertinentes tenham recebido formação adequada na aplicação dos princípios HACCP”.

Mais ainda se refere, conforme o Capítulo II, *Artigo 4º*, Ponto 3 deste regulamento, que os operadores das empresas dos sector alimentar, tomarão, se for caso disso, as seguintes medidas específicas de higiene: a) respeito dos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios; b) os processos necessários para respeitar os alvos estabelecidos para cumprir os objectivos do presente regulamento; c) respeito dos critérios de temperatura aplicáveis aos géneros alimentícios; d) manutenção da cadeia de frio; e) recolha de amostras e análises.

1.5.2 Boas Práticas de Higiene

Os Códigos de Boas Práticas definem os requisitos mínimos de higiene que devem ser adoptados, pelo sector alimentar, para garantir a segurança dos alimentos. Estes documentos são de utilização voluntária pelas empresas e podem ser elaborados pelas associações (Associação da Restauração e Similares de Portugal – ARESP), pelas autoridades sanitárias ou pelas próprias empresas.

Introdução

A higiene pessoal dos indivíduos envolvidos na manipulação e confecção de alimentos, bem como os comportamentos adoptados são fonte de preocupação pois estes são portadores de microrganismos ao nível do cabelo, nariz, boca, garganta, tracto intestinal, pele, mãos e unhas constituindo um dos principais veículos de contaminação microbiológica dos alimentos. O respeito de um Código de Boas Práticas de Higiene Pessoal que determine as regras, condições e práticas, permite um elevado grau de higiene e um comportamento adequado garantindo a segurança e higiene dos alimentos e, a consequente redução da probabilidade de ocorrência de doenças alimentares.

Seguidamente são referidas as regras contempladas no Código de Boas Práticas. Os manipuladores devem ser alvo de uma formação contínua e adequada, fornecida pelos responsáveis do estabelecimento, em matéria de higiene alimentar e pessoal. O seu objectivo é que aqueles sejam capazes de adoptar práticas que evitem a contaminação dos alimentos. Inclui igualmente a realização de exames médicos previamente ao início da actividade bem como em casos que sejam clínica e epidemiologicamente justificáveis. Os indivíduos que suspeitem sofrer, que sejam portadores de doença possivelmente transmitida aos alimentos, ou ainda, que apresentem feridas infectadas, infecções cutâneas ou diarreia estão proibidos de contactar, directa ou indirectamente, com os alimentos em qualquer área do local de produção. Devem inclusivamente informar os responsáveis do estabelecimento. Caso apresentem cortes ou feridas, estas devem estar firmemente protegidas por materiais coloridos e resistentes à água. A higienização das mãos deve ser efectuada com um produto de limpeza adequado e com água quente, potável e de pressão adequada. Deve ser efectuada previamente ao início da actividade, depois da manipulação de materiais contaminados, imediatamente após a utilização dos lavabos e sempre que seja necessário. Esta prática não é dispensada aquando do uso de luvas descartáveis as quais devem ser mantidas em condições de limpeza e higiene. Os manipuladores devem também manter um elevado grau de limpeza pessoal pelo que o vestuário deve ser exclusivo da área de trabalho. Os adornos que não possam ser devidamente higienizados e sejam inseguros devem ser retirados. Os comportamentos susceptíveis de contaminar os alimentos (comer, fumar, mastigar, cuspir, espirrar, entre outros) estão proibidos. Por último, a entrada de estranhos nas áreas de processamento alimentar deve respeitar todas as regras anteriormente referidas.

Introdução

1.5.3 Autocontrolo

O autocontrolo é um sistema de segurança alimentar baseado nos princípios HACCP. É um sistema que procura exercer um controlo contínuo no processamento de um alimento.

Nas actividades de autocontrolo deverão considerar-se os seguintes princípios: análise dos potenciais riscos alimentares para as actividades no sector alimentar; identificação das fases das operações em que tais riscos podem ocorrer; determinação dos pontos críticos para a segurança dos alimentos; definição e aplicação de um controlo eficaz e de processos de acompanhamento dos pontos críticos; revisão periódica, e sempre que haja alterações dos processos da empresa, da análise dos riscos, dos pontos críticos de controlo e dos processos de controlo e acompanhamento.

1.5.4 Controlos oficiais

Os controlos oficiais são efectuados por autoridades competentes para o exercício da função e devem considerar os códigos de boas práticas. Estas devem verificar se as empresas do sector alimentar aplicam e cumprem correctamente os procedimentos de higiene e segurança dos alimentos, especialmente nos pontos críticos de controlo evidenciados pelas empresas do sector alimentar. Neste sentido, exercem a sua função por meio de inspecções aos estabelecimentos para a avaliação de potenciais riscos, gestão dos riscos alimentares e comunicação dos riscos.

Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1 Parâmetros microbiológicos

O estudo microbiológico incidiu sobre a análise de alguns parâmetros em alimentos prontos a consumir. O trabalho foi realizado mediante a obtenção de dados originários de boletins analíticos do Centro de Formação Profissional de Segurança Alimentar (CFPSA). Estes dados resultam de análises microbiológicas a amostras de alimentos prontos a consumir, recolhidas por técnicos em estabelecimentos de restauração. São devidamente transportadas para o laboratório de ensaios do CFPSA. Foram efectuadas as seguintes análises microbiológicas: pesquisa de bactérias coliformes (NP 2164:1983), contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais a 30 °C (NP 4405:2002), contagem de coliformes (NP 3788:1990), pesquisa de *Staphylococcus aureus* (NP 2260:1986); pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores (NP 2262:1986), pesquisa de *Escherichia coli* (NP 2308:1986), contagem de *Escherichia coli* (NP 3496:2006), contagem de *Staphylococcus* coagulase-positiva (NP 4400:2002), pesquisa de *Listeria monocytogenes* (DTLE-TE 018 (VIDAS LM02-BIO 12/11-03/04)) e pesquisa de *Salmonella* (DTLE-TE 020 de 2005/01/06 (VIDAS ICS-BIO 12/7-03/00 e EN ISO 6579:2002).

2.1.1 Tipo de amostragem

Estabelecido o acordo entre o empresário e o CFPSA é definido no contrato, entre outros aspectos, o programa de colheita de amostras. Apesar de não existirem dois contratos iguais, a generalidade prevê três recolhas de amostras por ano.

Foram introduzidos os resultados dos ensaios microbiológicos a alimentos de todos os clientes que contratualizaram com a delegação de Lisboa do CFPSA relativos ao ano de 2006, isto é, 2115 registos relativos a 1021 estabelecimentos de restauração. Contudo, o presente estudo refere-se a 1981 ensaios pois 134 das amostras de alimentos recolhidas não se enquadravam na classificação de alimentos prontos a consumir proposta pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) (Quadro 4). Assim, o estudo incidiu sobre 1174 alimentos do G1, 298 alimentos do G2 e 509 alimentos do G3. A constituição pormenorizada da amostra utilizada neste estudo consta do Anexo 2 (Quadros 1 a 11) e as amostras de alimentos não classificadas por não se enquadrarem na classificação de alimentos prontos a consumir proposta pelo INSA são descritas no Anexo 3 (Quadro 1).

As amostras de alimentos foram recolhidas por técnicos especializados e certificados do CFPSA em estabelecimentos de restauração, no decorrer de auditorias higio-sanitárias. A empresa obriga-se a permitir-lhes o acesso a toda a informação necessária para a realização do trabalho. As amostras são escolhidas, recolhidas e transportadas refrigeradas

Materiais e Métodos

pelos técnicos, em condições de assepsia. No formulário, específico para a recolha de amostras, é descrito o tipo de alimento (cozinhado, cru, misto) e as condições da recolha (momento da recolha, local e informações relevantes para a interpretação dos resultados). O objectivo do trabalho dos técnicos consiste na avaliação das condições de higiene em que decorreu o processo (manipuladores, equipamentos e utensílios), averiguar a qualidade das matérias-primas e práticas de higienização dos produtos, observar a ocorrência ou não de contaminação cruzada, verificar a adequabilidade das temperaturas de conservação e da eficácia do tratamento térmico e posterior contaminação e, envolver todos os colaboradores do estabelecimento divulgando os resultados e as medidas correctivas a implementar.

Quadro 4. Grupos de alimentos prontos a consumir (adaptado de Santos *et al.*, 2005)

Grupo	Produto	Exemplos
G1	Refeições/Sandes/Bolos/Sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT e de maionese industrializada.	Feijoada Pizza Bacalhau à Brás com salsa previamente processada Salada de batata com maionese industrial Pastéis de bacalhau/Croquetes/ Rissóis Sandes de carne assada Sandes de <i>paté</i> de atum (maionese industrial) Omeleta de Queijo /fiambre <i>Mousse</i> de chocolate instantânea Bolo de chocolate Arroz doce com ou sem canela Gelatinas Salada de fruta/fruta laminada em calda.
G2	Refeições/Sandes/Bolos/Sobremesas doces cozinhadas adicionadas de ingredientes crus e/ou com flora específica própria	Salada de batata com tomate/alface Salada de feijão-frade com atum, salsa e cebola picada ou molho vinagrete Prato de peixe/carne/ovos adicionado de salada de vegetais ou frutos Bacalhau à Brás c/ salsa crua e/ou azeitonas Sandes com carne assada e alface Sandes de fiambre, queijo ou enchidos <i>Mousse</i> de chocolate Pudins com fruta ao natural Salada de fruta em calda adicionada de fruta ao natural.
G3	Saladas/ Vegetais/Frutos crus	Alface Tomate Cenoura Couve roxa Salada de frutas Fruta ao natural laminada Morangos.

Materiais e Métodos

2.1.2 Constituição da base de dados

Os dados constantes nos boletins analíticos foram introduzidos numa base de dados (desenvolvida para este trabalho) em programa informático Microsoft Office Access 2003. Desta constam variáveis como: a data de recolha da amostra, o alimento recolhido, a categoria do alimento (de acordo com a classificação proposta pelo INSA para alimentos prontos a consumir e baseada nos ingredientes que o constituem, no tratamento térmico ou outro a que sejam submetidos) e os parâmetros microbiológicos – contagem de mesófilos (ufc/g), contagem de coliformes totais (ufc/g), contagem de leveduras (ufc /g), contagem de bolores (ufc /g) contagem de *E. coli* (ufc /g), pesquisa de *L. monocytogenes* em 25g, contagem de *L. monocytogenes* em 1g (ufc /g), contagem de *Staphylococcus* coagulase-positiva (ufc /g) e pesquisa de *Salmonella* em 25g.

Na inserção dos dados relativos às variáveis “categoria do alimento”, e aos parâmetros microbiológicos “pesquisa de *L. monocytogenes* em 25g” e “pesquisa de *Salmonella* em 25g” adoptou-se a concepção de escalas nominais de codificação numérica que são, respectivamente, (0 – grupo 1; 1 – grupo – 2; 2 – grupo 3) e (0 – ausente; 1 - presente). Os restantes parâmetros foram directamente introduzidos como valores numéricos.

2.2 Análise de dados

Os instrumentos utilizados na análise dos resultados analíticos são os Valores Guia do INSA pois a legislação portuguesa é omissa no que se refere à grande maioria dos produtos prontos a consumir. São critérios microbiológicos baseados na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, microrganismos indicadores e a presença ou número de determinados patogénicos. Constituem linhas de orientação para avaliação da qualidade microbiológica dos produtos (Quadro 5) e representam limites a partir dos quais as determinações microbiológicas, quantitativas e qualitativas, permitem qualificar o produto segundo níveis de qualidade/segurança (Quadro 6). Servem para identificar situações que requerem monitorização e permitem evidenciar a necessidade de implementação de medidas correctivas posteriores.

Materiais e Métodos

Quadro 5. Valores Guia da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a consumir (adaptado de Santos *et al.*, 2005)

Microrganismo	Grupo de alimentos	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável /potencialmente perigoso
Microrganismos a 30°C	1	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$> 10^3 \leq 10^5$	$> 10^5$	NA
	3	$\leq 10^4$	$> 10^4 \leq 10^6$	$> 10^6$	NA
Leveduras	1* e 2	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
	3	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^5$	$> 10^5$	NA
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	$> 10 \leq 10^3$	$> 10^3$	NA
	3	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
<i>E. coli</i>	1, 2	< 10	NA	≥ 10	NA
	3	≤ 10	$> 10 < 10^2$	$\geq 10^2$	NA
<i>Listeria spp.</i>	1, 2 e 3	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
Anaeróbios sulfito Redutores	1, 2 e 3	≤ 10	$> 10 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$ #
Patogénicos					
<i>Staphylococcus coagulase Positiva</i>	1, 2 e 3	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	1, 2 e 3	$\geq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^5$	$\geq 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	1, 2 e 3	< 10	$\geq 10 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Salmonella spp.</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g	Presente em 25g $< 10^2$ #	-	$\geq 10^2$
<i>Campylobacter spp.</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g

* - Aplicável em produtos conservados no frigorífico

- Equacionado caso a caso

NA – Não aplicável

Materiais e Métodos

Quadro 6. Níveis de qualidade microbiológica para produtos prontos a consumir (Santos *et al.*, 2005)

Nível de qualidade microbiológica	Definição
Satisfatório	Os resultados analíticos indicam uma boa qualidade microbiológica.
Aceitável	Os resultados analíticos indicam que o produto se encontra dentro dos limites estabelecidos.
Não satisfatório	Os resultados analíticos indicam que o produto não satisfaz um ou mais dos valores estabelecidos.
Inaceitável/potencialmente perigoso	Os resultados analíticos indicam a presença de microrganismos patogénicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde. Este resultado deve ser comunicado imediatamente à unidade onde foi detectado, para que sejam tomadas as medidas que permitam corrigir a situação.

2.3 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi executada com recurso ao programa informático SAS (SAS Institute, version 9.1, Cary, NC). Para a comparação entre grupos foi utilizado o método do Qui-quadrado ou teste exacto de Fisher, para um nível de significância de 0,05.

Resultados

3. Resultados

3.1 Análise microbiológica de alimentos

Na caracterização microbiológica os alimentos prontos a consumir pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 foram classificados segundo o nível de qualidade microbiológica em satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis

Nos quadros 7 a 14 são apresentadas as frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica para mesófilos, bolores, leveduras, coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, respectivamente. A frequência relativa entre grupos de alimentos refere, para cada nível de qualidade microbiológica, a proporção de alimentos de G1, G2 e G3 (leitura horizontal do quadro). A frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica refere, para o grupo de alimentos (G1, G2 ou G3) a proporção de alimentos que consta em cada nível de qualidade (leitura vertical do quadro).

Quadro 7. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando são detectados microrganismos aeróbios mesófilos totais.

		G1	G2	G3	Total
S+A	Frequência absoluta	986	237	509	1732
	Frequência relativa	49,77	11,96	25,69	87,43
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	56,93	13,68	29,39	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	83,99	79,53	100,00	
NS	Frequência absoluta	188	61	0	249
	Frequência relativa	9,49	3,08	0,00	12,57
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	75,50	24,50	0,00	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	16,01	20,47	0,00	
Total		1174 59,26	298 15,04	509 25,69	1981 100

Legenda: S – Satisfatório; A – Aceitável; NS – Não satisfatório

Resultados

Quadro 8. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando são detectados bolores.

		G1	G2	G3	Total
S+A	Frequência absoluta	1154	291	464	1909
	Frequência relativa	58,25	14,69	23,42	96,37
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	60,45	15,24	24,31	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	98,30	97,65	91,16	
NS	Frequência absoluta	20	7	45	72
	Frequência relativa	1,01	0,35	2,27	3,63
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	27,78	9,72	62,50	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	1,70	2,35	8,84	
Total		1174 59,26	298 15,04	509 25,69	1981 100

Legenda: S – Satisfatório; A – Aceitável; NS – Não satisfatório

Quadro 9. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando são detectadas leveduras.

		G1	G2	G3	Total
S+A	Frequência absoluta	1130	276	509	1915
	Frequência relativa	57,04	13,93	25,69	96,67
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	59,01	14,41	26,58	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	96,25	92,62	100,00	
NS	Frequência absoluta	44	22	0	66
	Frequência relativa	2,22	1,11	0,00	3,33
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	6,67	33,33	0,00	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	3,75	7,38	0,00	
Total		1174 59,26	298 15,04	509 25,69	1981 100

Legenda: S – Satisfatório; A – Aceitável; NS – Não satisfatório

Resultados

Quadro 10. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando são detectados coliformes totais.

		G1	G2	G3	Total
S+A	Frequência absoluta	989	227	347	1563
	Frequência relativa	49,92	11,46	17,52	78,90
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	63,28	14,52	22,20	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	84,24	76,17	68,17	
NS	Frequência absoluta	185	71	162	418
	Frequência relativa	9,34	3,58	8,18	21,10
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	44,26	16,99	38,76	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	15,76	23,83	31,83	
Total		1174 59,26	298 15,04	509 25,69	1981 100

Legenda: S – Satisfatório; A – Aceitável; NS – Não satisfatório

Quadro 11. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando é detectada *Escherichia coli*.

		G1	G2	G3	Total
S+A	Frequência absoluta	1124	270	509	1903
	Frequência relativa	56,74	13,63	25,69	96,06
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	59,06	14,19	26,75	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	95,74	90,60	100,00	
NS	Frequência absoluta	50	28	0	78
	Frequência relativa	2,52	1,41	0,00	3,94
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	64,10	35,90	0,00	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	4,26	9,40	0,00	
Total		1174 59,26	298 15,04	509 25,69	1981 100

Legenda: S – Satisfatório; A – Aceitável; NS – Não satisfatório

O teste de Qui-quadrado revelou que, da análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológicas, quando foram detectados microrganismos aeróbios mesófilos totais, bolores, leveduras, coliformes totais e *Escherichia coli* (quadros 7, 8, 9, 10 e 11), as diferenças foram significativas ($p < 0,0001$).

Resultados

Quadro 12. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando é detectado *Staphylococcus* coagulase-positiva.

		G1	G2	G3	Total
S	Frequência absoluta	1163	293	499	1955
	Frequência relativa	58,71	14,79	25,19	98,69
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	59,49	14,99	25,52	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	99,06	98,32	98,04	
NS	Frequência absoluta	10	5	10	25
	Frequência relativa	0,50	0,25	0,50	1,26
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	40,00	20,00	40,00	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	0,85	1,68	1,96	
I	Frequência absoluta	1	0	0	1
	Frequência relativa	0,05	0,00	0,00	0,05
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	100,00	0,00	0,00	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	0,09	0,00	0,00	
Total		1174 59,26	298 15,04	509 25,69	1981 100

Legenda: S – Satisfatório; NS – Não satisfatório; I – Inaceitável

O teste de Qui-quadrado revelou que, da análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológica, as diferenças verificadas não foram significativas ($p=0,3200$).

Quadro 13. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando é detectada *Salmonella* spp.

		G1	G2	G3	Total
S	Frequência absoluta	1155	297	501	1953
	Frequência relativa	59,11	15,20	25,64	99,95
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	59,14	15,21	25,65	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	99,91	100,00	100,00	
I	Frequência absoluta	1	0	0	1
	Frequência relativa	0,05	0,00	0,00	0,05
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	100,00	0,00	0,00	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	0,09	0,00	0,00	
Total		1156 59,16	297 15,20	501 25,64	1954 100,00

Legenda: S – Satisfatório; I - Inaceitável

Resultados

O teste de Qui-quadrado revelou que, da análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológicas, as diferenças verificadas não foram significativas ($p=0,7080$).

Quadro 14. Frequências dos alimentos pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando é detectada *Listeria monocytogenes*.

		G1	G2	G3	Total
S	Frequência absoluta	519	220	345	1084
	Frequência relativa	46,80	19,84	31,11	97,75
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	47,88	20,30	31,83	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	97,74	96,92	98,29	
I	Frequência absoluta	12	7	6	25
	Frequência relativa	1,08	0,63	0,54	2,25
	Frequência relativa entre grupos de alimentos	48,00	28,00	24,00	
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	2,26	3,08	1,71	
Total		531 47,88	227 20,47	351 31,65	1109 100,00

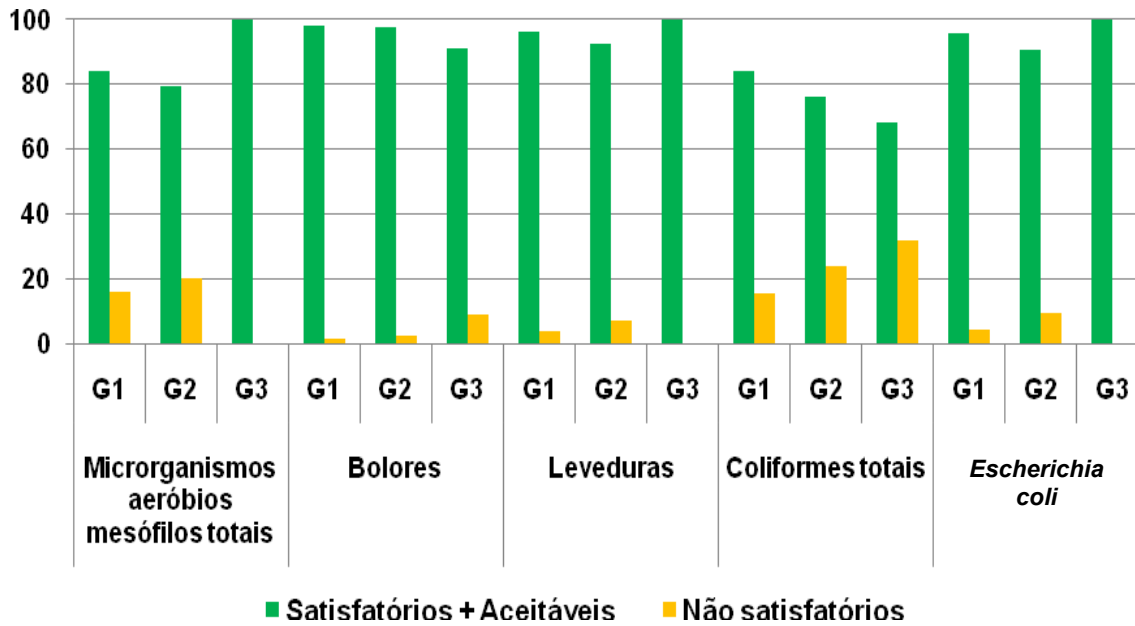
Legenda: S – Satisfatório; I - Inaceitável

O teste de Qui-quadrado revelou que da análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológicas as diferenças verificadas não foram significativas ($p=0,5539$).

A figura 2 refere-se à prevalência dos níveis de qualidade microbiológica de acordo com o número de microrganismos aeróbios mesófilos totais, bolores, leveduras, coliformes totais e *Escherichia coli*.

Resultados

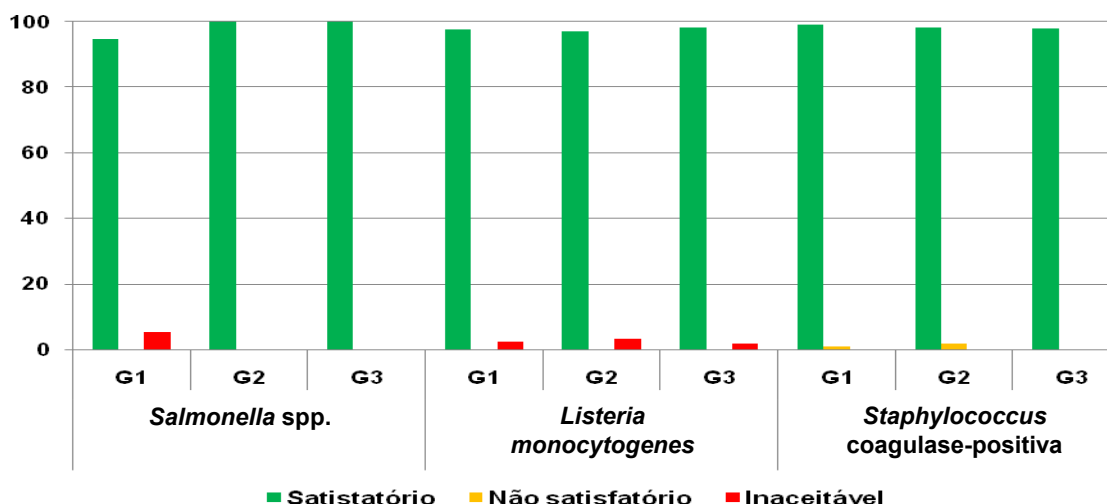
Figura 2. Prevalência de mesófilos, bolores, leveduras, coliformes totais e *Escherichia coli* nos alimentos de acordo com a categoria.



A figura 3 refere-se à prevalência dos níveis de qualidade microbiológica no que respeita à determinação de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *Staphylococcus* coagulase-positiva nos alimentos.

Resultados

Figura 3. Prevalência de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *Staphylococcus* coagulase-positiva nos alimentos de acordo com a categoria.



O quadro seguinte apresenta as frequências absolutas dos alimentos pertencentes a cada uma das categorias que foram considerados não satisfatórios e inaceitáveis, de acordo com a determinação microbiológica efectuada.

Quadro 15. Frequências absolutas dos alimentos não satisfatórios e inaceitáveis de acordo com o microrganismo analisado.

Microrganismo	Não satisfatório			Inaceitável		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Microrganismos aeróbios mesófilos totais	188	61	0	-	-	-
Bolores	20	7	45	-	-	-
Leveduras	44	22	0	-	-	-
Coliformes totais	185	71	162	-	-	-
<i>E. coli</i>	50	28	0	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	-	1	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	12	7	6
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	10	5	10	1	0	0
Total de alimentos	497	194	217	14	7	6

Resultados

Pela análise do quadro anterior verifica-se que os alimentos classificados como não satisfatórios são maioritariamente pertencentes ao grupo G1 (497), seguindo-se os do grupo G3 (210) e do grupo G2 (194). Para alimentos dos grupos G1 e G2 as bactérias aeróbias mesófilas totais (188 e 61, respectivamente) e os coliformes totais (185 e 71, respectivamente) foram aqueles que estiveram mais frequentemente presentes. Nos alimentos G3, não foram detectados aeróbios mesófilos totais mas os coliformes totais estiveram presentes em 162 dos casos. Para alimentos pertencentes ao G1 foram detectadas bactérias patogénicas (*E. coli* e *Staphylococcus coagulase-positiva*). A *E. coli* foi detectada em 50 alimentos tais como: Bacalhau com natas; Esparguete com vitela estufada; Almôndegas de porco com esparguete; Frango assado com ou sem arroz branco; Vitela assada; *Linguini* com frango e curgetes; Arroz de pato, carne de novilho, porco, frango e pato; Picanha; Frango cozido e desfiado; Rissol de carne; crepes; salgado de galinha, folhado de camarão; Jardineira; Quiche de legumes e salsicha; Salada Russa, de mexilhão e camarão; sandes de delícias do mar com maionese, de omeleta de camarão; Bolo de ananás, Mil-folhas; Bola de Berlim; natas; queijada de requeijão; Russo; Torta de ovos. *Staphylococcus coagulase-positiva* foi detectada em 10 alimentos do G1 que são: Açorda de tomate; Carne assada fatiada; Empada de atum e de galinha; Frango; Perna de peru assada com batata corada e laranja; Recheio para crepe; Rissol de carne; Éclair; Russo. Também foram detectados patogénicos nalguns alimentos do G2, isto é, 28 com *E. coli* e 5 com *Staphylococcus coagulase-positiva*. No primeiro caso os alimentos identificados foram: Maionese de peixe; Pasta de camarão, de delícias do mar, de frango, de atum; de massa de frango; Salada fria de milho, Mediterrânica, Portuguesa; Sandes mista; *Sushi*; *Uramaki*; Baba de camelo. No último caso, detectou-se o patogénico nos seguintes alimentos: Salada de atum, de feijão-frade, de polvo e Tropical; Bolo de chocolate com nozes. Nos alimentos pertencentes a G3 o único patogénico detectado foi *Staphylococcus coagulase-positiva*, num total de 10 alimentos: alface, cenoura, tomate cortado, salada mista, salada verde.

Na categoria dos alimentos classificados como inaceitáveis foram detectadas bactérias patogénicas. Nos alimentos do G1 foram detectados: *Salmonella* spp. em Frango à Brás; *L. monocytogenes* em 12 alimentos (Arroz de peixe, Coxinhas de galinha, Frango, Ovo cozido, *Rigatoni* com salmão, Rissóis de carne e de camarão, Salgado de galinha, Vitela assada, Bolo de chocolate) e *Staphylococcus coagulase-positiva* em Carne assada. Em alimentos do G2 (7) e G3 (6) foi verificada a presença de *L. monocytogenes*. No primeiro caso (G2) os alimentos foram Pasta de camarão, de delícias do mar, de frango e de caranguejo; *Cheesecake* e *Mousse de caramelo*, enquanto, no último caso, os alimentos foram Salada mista e Verde, vegetais, Salada de fruta, Gelado de morango.

Resultados

3.2 Distribuição sazonal

A análise da distribuição sazonal dos níveis de qualidade microbiológica foi efectuada para cada um dos grupos de alimentos prontos a consumir nos quatro trimestres (T1, T2, T3 e T4) do ano. Nos quadros 16 a 19 são apresentadas as frequências absolutas e as frequências relativas dos alimentos de acordo com os níveis de qualidade microbiológica em cada trimestre para microrganismos aeróbios mesófilos totais, bolores, leveduras e coliformes totais. Deles constam a proporção de alimentos pertencentes a G1, G2 e G3, de acordo com o nível de qualidade microbiológica. Nas figuras 4 a 11 apresenta-se a distribuição sazonal dos alimentos de cada categoria para os níveis de qualidade determinados.

Quadro 16. Frequências dos alimentos de G1, G2 e G3 por trimestre (T1, T2, T3 e T4) de acordo com os níveis de qualidade microbiológica quando são detectados microrganismos aeróbios mesófilos totais.

			T1	T2	T3	T4	Total
G1	S+A	Frequência absoluta	270	292	225	199	986
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	86,82	81,34	82,12	86,52	
	NS	Frequência absoluta	41	67	49	31	188
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	13,18	18,66	17,88	13,48	
Total			311	359	274	230	1174
G2	S+A	Frequência absoluta	58	94	48	37	237
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	86,57	79,66	78,69	71,15	
	NS	Frequência absoluta	9	24	13	15	61
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	13,43	20,34	21,31	28,85	
Total			67	118	61	52	298
G3	S+A	Frequência absoluta	115	191	140	63	509
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	100,00	100,00	100,00	100,00	
	Total			115	191	140	63

Legenda: S – Satisfatórios; A – Aceitáveis; NS – Não satisfatórios;

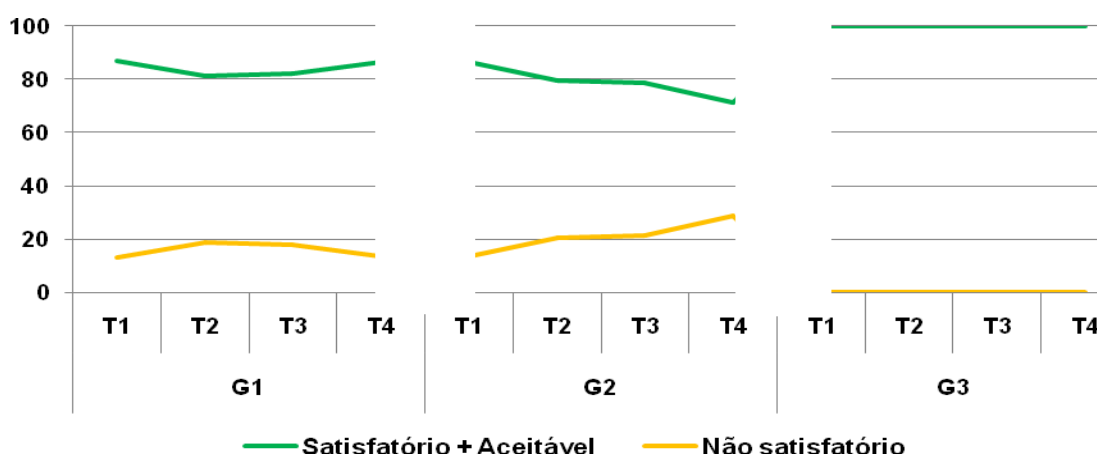
T1 – primeiro trimestre; T2 – segundo trimestre;

T3 – terceiro trimestre; T4 – quarto trimestre

O teste de Qui-quadrado evidenciou que as diferenças sazonais para o grupo G1 ($p=0,1364$) e para o grupo G2 ($p=0,2302$) não são significativas para os níveis de qualidade microbiológica.

Resultados

Figura 4. Distribuição sazonal dos alimentos G1, G2 e G3 para os quais foram detectados microbiológica quando são detectados microrganismos aeróbios mesófilos totais de acordo com o nível de qualidade microbiológica.



Legenda: T1 – primeiro trimestre; T2 – segundo trimestre;
T3 – terceiro trimestre; T4 – quarto trimestre;

Quadro 17. Frequências dos alimentos de G1, G2 e G3 por trimestre de acordo com o nível de qualidade microbiológica quando são detectados bolores.

			T1	T2	T3	T4	Total
G1	S+A	Frequência absoluta	311	352	262	229	1154
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	100	98,05	95,62	99,57	
	NS	Frequência absoluta	0	7	12	1	20
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	0	1,95	4,38	0,43	
	Total			311	359	274	230
G2	S+A	Frequência absoluta	67	113	60	51	291
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	100	95,76	98,36	98,08	
	NS	Frequência absoluta	0	5	1	1	7
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	0	4,24	1,64	1,92	
	Total			67	118	61	52
G3	S+A	Frequência absoluta	115	177	116	56	464
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	100	92,67	82,86	88,89	
	NS	Frequência absoluta	0	14	24	7	45
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	0	7,33	17,14	11,11	
	Total			115	191	140	63

Legenda: S – Satisfatórios; A – Aceitáveis; NS – Não satisfatórios

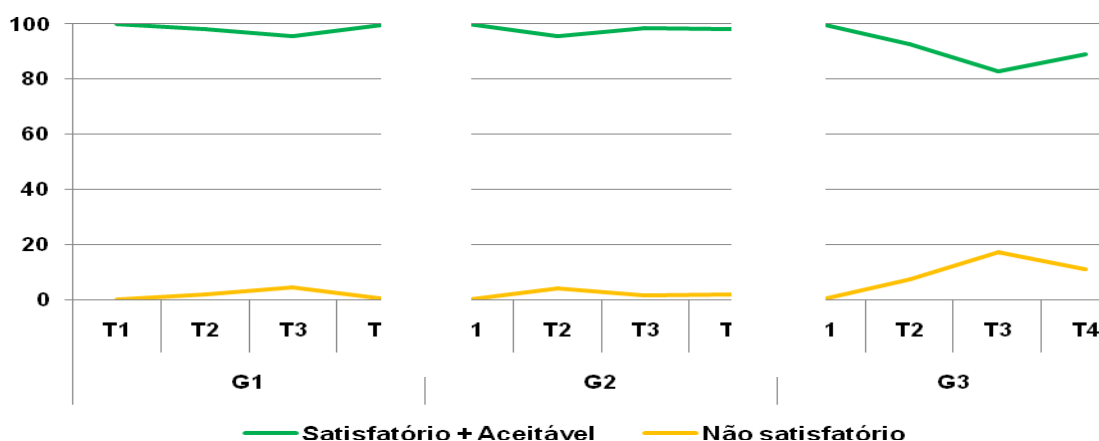
T1 – primeiro trimestre; T2 – segundo trimestre;

T3 – terceiro trimestre; T4 – quarto trimestre

Resultados

O teste de Qui-quadrado evidenciou que as diferenças sazonais para os grupos G1 ($p=0,0002$) e G3 ($p < 0,0001$) são significativas para os níveis de qualidade microbiológica, contrariamente, ao que se verificou para o grupo G2 ($p=0,3054$).

Figura 5. Distribuição sazonal dos alimentos G1, G2 e G3 para os quais foram detectados bolores de acordo com o nível de qualidade microbiológica.



Legenda: T1 – primeiro trimestre; T2 – segundo trimestre;
T3 – terceiro trimestre; T4 – quarto trimestre

Quadro 18. Frequências dos alimentos de G1, G2 e G3 por trimestre de acordo com o nível de qualidade microbiológica quando são detectadas leveduras.

			T1	T2	T3	T4	Total
G1	S+A	Frequência absoluta	311	343	252	224	1130
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	100	95,54	91,97	97,39	
	NS	Frequência absoluta	0	16	22	6	44
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	0	4,46	8,03	2,61	
Total			311	359	274	230	1174
G2	S+A	Frequência absoluta	67	105	55	49	276
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	100	88,98	90,16	94,23	
	NS	Frequência absoluta	0	13	6	3	22
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	0	11,02	9,84	5,77	
Total			67	118	61	52	298
G3	S+A	Frequência absoluta	115	191	140	63	509
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	100	100	100	100	
	Total			115	191	140	63

Legenda: S – Satisfatórios; A – Aceitáveis; NS – Não satisfatórios

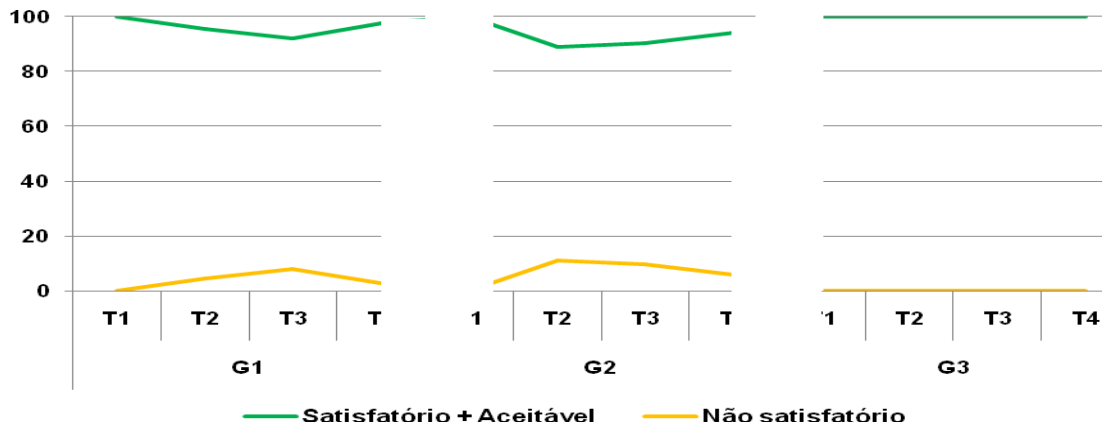
T1 – primeiro trimestre; T2 – segundo trimestre;

T3 – terceiro trimestre; T4 – quarto trimestre

Resultados

O teste de Qui-quadrado evidenciou que as diferenças sazonais para alimentos do G1 ($p < 0,0001$) e do G2 ($p=0,0392$) são significativas para os níveis de qualidade microbiológica.

Figura 6. Distribuição sazonal dos alimentos G1, G2 e G3 para os quais foram detectados leveduras de acordo com o nível de qualidade microbiológica.



Legenda: T1 – primeiro trimestre; T2 – segundo trimestre;
T3 – terceiro trimestre; T4 – quarto trimestre

Resultados

Quadro 19. Frequências dos alimentos de G1, G2 e G3 por trimestre de acordo com o nível de qualidade microbiológica quando são detectados coliformes totais.

			T1	T2	T3	T4	Total	
G1	S+A	Frequência absoluta	276	293	220	200	989	
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	88,75	81,62	80,29	86,96		
	NS	Frequência absoluta	35	66	54	30	185	
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	11,25	18,38	19,71	13,04		
	Total			311	359	274	230	1174
	G2	S+A	Frequência absoluta	60	91	40	36	227
Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica			89,55	77,12	65,57	69,23		
NS		Frequência absoluta	7	27	21	16	71	
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	10,45	22,88	34,43	30,77		
Total			67	118	61	52	298	
G3		S+A	Frequência absoluta	95	124	91	37	347
	Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica		82,61	64,92	65	58,73		
	NS	Frequência absoluta	20	67	49	26	162	
		Frequência relativa entre níveis de qualidade microbiológica	17,39	35,08	35	41,27		
	Total			115	191	140	63	509

Legenda: S – Satisfatórios; A – Aceitáveis; NS – Não satisfatórios;

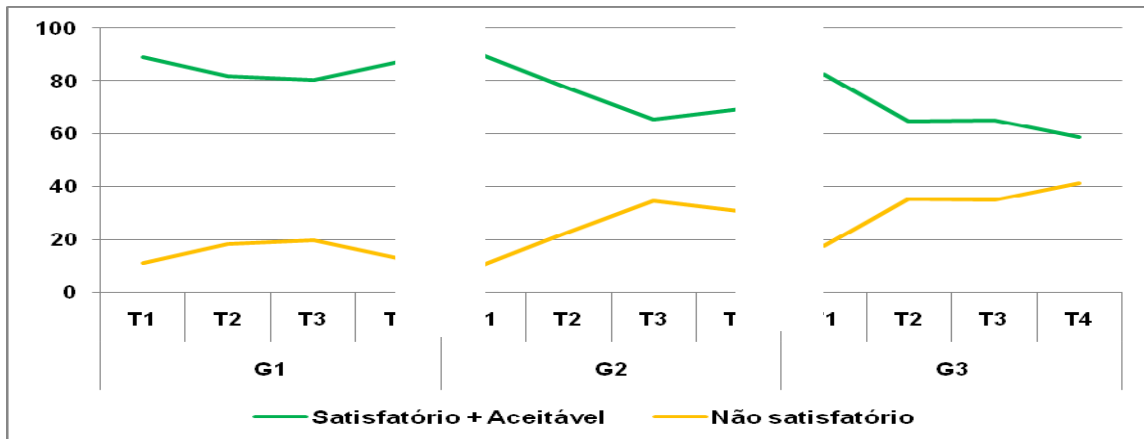
T1 – primeiro trimestre; T2 – segundo trimestre;

T3 – terceiro trimestre; T4 – quarto trimestre

O teste de Qui-quadrado evidenciou que as diferenças sazonais para alimentos do G1 ($p=0,0111$), do G2 ($p=0,0080$) e do G3 ($p=0,0016$) são significativas para os níveis de qualidade microbiológica.

Resultados

Figura 7. Distribuição sazonal dos alimentos G1, G2 e G3 para os quais foram detectados coliformes totais de acordo com o nível de qualidade microbiológica.



Legenda: T1 – primeiro trimestre; T2 – segundo trimestre;
T3 – terceiro trimestre; T4 – quarto trimestre

Discussão

4. Discussão

4.1 Metodologia adoptada

Para se avaliar a relevância dos resultados obtidos neste estudo é necessário atender às variáveis que os podem condicionar, nomeadamente as técnicas metodológicas.

A análise dos resultados analíticos é efectuada com base nos Valores Guia do INSA pois a legislação portuguesa é omissa no que se refere à grande maioria dos produtos prontos a consumir. Na fixação de um critério microbiológico, deve ter-se em atenção os microrganismos patogénicos e/ou suas toxinas, as diferenças regionais na prevalência dos patogénicos e nas práticas de produção de alimentos, os microrganismos de degradação do alimento e os microrganismos indicadores, os quais estão dependentes do alimento, do tipo de amostra colhida e do momento da amostragem. O agrupamento dos alimentos prontos a consumir proposto pelo INSA é baseado no tipo de ingredientes constituintes, o tratamento térmico ou outro (desidratação, radiação ionizante e produtos submetidos a tratamentos UHT) procedimento que lhes é ou não aplicado no momento da confecção. Caso os alimentos sejam submetidos a tais tratamentos (G1), verifica-se a redução ou eliminação da sua carga microbiana. Por conseguinte, nos grupos G1 e G2, para o mesmo nível de qualidade microbiológica, o INSA define limites mais apertados relativamente ao grupo G3.

A interpretação dos resultados analíticos revela-se muitas vezes uma etapa de grande complexidade, quando se pretende avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos. Por exemplo, os termos usados pelo INSA para expressar os níveis de qualidade microbiológica nos alimentos cozinhados prontos a consumir são: satisfatório, aceitável, não satisfatório e inaceitável (Capítulo 2.2). Para cada intervalo estão definidos os limites. Se considerarmos que estes valores variam de país para país e ao longo do tempo, concluímos que os intervalos que balizam os níveis de qualidade microbiológica têm algum grau de subjectividade. Esta circunstância determinou o agrupamento dos níveis satisfatório e aceitável na discussão dos resultados. Ainda a este propósito importa referir algumas limitações na interpretação dos resultados das análises microbiológicas. Nomeadamente (Lacasse, 1995): os microrganismos raramente estão distribuídos de forma homogénea num alimento; os alimentos comportam uma flora microbiana muito diversificada; os agentes microbianos potencialmente patogénicos podem estar presentes sem provocarem uma toxinfecção alimentar; nenhuma análise permite verificar na sua totalidade a flora presente; várias espécies patogénicas são dificilmente postas em evidência nos meios e nas condições de cultura clássicas dos laboratórios. Alguns exemplos: os vírus não são detectáveis pelas técnicas microbiológicas convencionais, os tratamentos aplicados aos

Discussão

alimentos antes da sua análise (frio, aquecimento, conservantes químicos) podem eliminar, inibir ou retardar o crescimento de determinados agentes patogénicos.

4.2 Análise microbiológica

A caracterização microbiológica das 1981 amostras de alimentos prontos a consumir foi efectuada para os seguintes parâmetros: contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais, contagem de bolores, contagem de leveduras, contagem de coliformes totais, contagem de *E. coli*, pesquisa de *Salmonella* spp., pesquisa e contagem de *L. monocytogenes* (a contagem é efectuada quando o patogénico esteve presente) e contagem de *Staphylococcus* coagulase-positiva.

4.2.1 Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais

A partir da análise dos resultados obtidos constatou-se que, na totalidade das 1981 amostras de alimentos, a maioria (87,43%) apresentou níveis satisfatórios e aceitáveis, enquanto uma reduzida proporção foi não satisfatória (12,57%). Este facto foi igualmente verificado quando os grupos de alimentos são considerados isoladamente (Quadro 7). No total de amostras analisadas e, para ambos os níveis de qualidade, a frequência de alimentos foi superior para os pertencentes ao G1, seguindo-se os do G2 e, por fim, os do G3 (Quadro 7). A maior proporção de amostras não satisfatórias foi registada para os alimentos pertencentes ao G2 (20,47%) (Quadro 7). Da análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológica verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,0001$).

Pela análise sazonal, as diferenças não foram significativas para os alimentos do G1 ($p=0,1364$) e do G2 ($p=0,2302$), no que respeita aos níveis de qualidade microbiológica (Quadro 16; Figura 4). Estes resultados sugerem que a temperatura ambiente não tem grande influência no aumento da flora mesófila.

Este parâmetro é importante para verificar as boas práticas de fabrico. Os resultados não satisfatórios (12,57%) podem estar associados à má qualidade das matérias-primas e reduzida limpeza (3,08% de alimentos G2) e a uma relação tempo/temperatura indevida (9,49% de alimentos G1). Na análise de um alimento não é possível avaliar, com um único teste, a totalidade da sua carga microbiana porque os meios de cultura favorecem, necessariamente, determinados grupos microbianos em detrimento de outros. Não é possível, por exemplo, fazer crescer simultaneamente as floras mesófila, psicrófila e termófila nas mesmas condições de temperatura. Escolhe-se a flora mesófila porque esta exige as mesmas condições de crescimento que a maioria das espécies patogénicas. Além disso, os alimentos envolvidos em toxinfecções alimentares raramente têm uma flora microbiana inferior a 10^5 ufc/g (Lacasse, 1995). Porém, uma

Discussão

contagem elevada da flora mesófila aeróbia está associada, na maior parte das vezes, a um forte crescimento da flora banal de degradação (Lacasse, 1995). Por último, as qualidades organolépticas dos alimentos e a duração da sua conservação estão muitas vezes em relação inversa com a sua carga microbiana.

As medidas de controlo que devem ser aplicadas são as seguintes: aplicação de uma temperatura satisfatória no processamento, armazenamento e distribuição do alimento, manutenção da cadeia de frio, boas condições higiénicas na produção ou armazenamento.

4.2.2 Contagem de Bolores e de Leveduras

Os resultados da análise microbiológica a 1981 amostras de alimentos revelaram que a maioria continha bolores a níveis satisfatórios e aceitáveis havendo uma reduzida proporção de não satisfatórios, isto é, 1909 (96,37%) e 72 (3,63%) alimentos, respectivamente. O mesmo verifica-se quando a análise é efectuada por grupos de alimentos (Quadro 8). Os alimentos satisfatórios e aceitáveis foram maioritariamente do G1 (58,25%), enquanto os não satisfatórios foram principalmente registados para os do G3 (8,84%) (Quadro 8). Da análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológica resultaram diferenças significativas ($p < 0,0001$).

Estes resultados são justificados pela presença de bolores no ambiente de processamento, deficiências de higiene no processamento ou posterior contaminação aquando do armazenamento (mesmo em refrigeração podem estar presentes espécies psicrófilas e os esporos sobrevivem e germinam em condições adequadas), equipamentos e utensílios indevidamente higienizados. Os bolores, em condições favoráveis, podem crescer e a sua carga tornar-se significativamente superior, originando alimentos não satisfatórios. Caso haja um crescimento significativo pode ocorrer produção de micotoxinas.

A interpretação dos resultados obtidos para a presença de leveduras nas amostras de alimentos é semelhante àquela efectuada para a presença de bolores. Deste modo, em 1981 amostras de alimentos, 96,67% revelou-se satisfatória e aceitável e apenas 3,33% mostraram-se como não satisfatórias. O mesmo foi verificado considerando os grupos de alimentos (Quadro 9). Tal como no caso da presença de bolores, também foram os alimentos pertencentes a G1 aqueles que apresentaram melhores resultados relativamente aos restantes grupos. Contudo, difere no facto de não ocorrer nenhuma amostra de G3 não satisfatória (Quadro 9). A análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológica revelou diferenças significativas ($p < 0,0001$).

A distribuição sazonal revelou que, para ambos os parâmetros microbiológicos, os alimentos não satisfatórios ocorreram com maior frequência no segundo e terceiro

Discussão

trimestres para os de G2 e G1, respectivamente. Quanto à presença de bolores em alimentos G3, verificou-se que a maior proporção destes alimentos ocorreu no terceiro trimestre (Quadros 17 e 18; Figuras 5 e 6). Estes resultados podem ser explicados pelas temperaturas mais elevadas características desta época do ano.

4.2.3 Contagem de coliformes totais

Os resultados obtidos a partir da análise de 1981 amostras de alimentos revelaram que 78,90% e 21,10% possuíam um nível de qualidade satisfatório e aceitável e não satisfatório, respectivamente. Considerando os grupos de alimentos isoladamente também a proporção de satisfatórios e aceitáveis foi superior relativamente à de não satisfatórios (Quadro 10). No total de amostras de alimentos, tanto para satisfatórios e aceitáveis como para não satisfatórios, a maior proporção registou-se para os pertencentes ao G1 seguindo-se o G3 e o G2 (Quadro 10). Pode ainda referir-se que houve maior número de alimentos do G3 não satisfatórios quando comparado com G2 ou G1 (Quadro 10). A análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológica não revelou diferenças significativas ($p < 0,0001$).

A análise sazonal revelou diferenças significativas entre resultados para alimentos G1 ($p=0,0111$), G2 ($p=0,0080$) e G3 ($p=0,0016$) satisfatórios e aceitáveis e não satisfatórios. A maior proporção de alimentos com coliformes totais foi registada no segundo e terceiro trimestres (Quadro 19; Figura 7). Estes resultados estão consentâneos com os obtidos para os bolores e leveduras e poderão ser explicados pelo aumento da temperatura ambiente.

Os coliformes são testemunhas importantes quer a nível de higiene quer da manutenção de frio, ou de ambos. Não obstante, este indicador servir para avaliar o grau de contaminação fecal, deve-se conhecer os seus limites de interpretação. A limitação mais importante provém da sua falta de especificidade. De facto, determinadas estirpes (especialmente dos géneros *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*) têm um *habitat* natural extra-intestinal ou não fazem parte do todo das enterobactérias (exemplo: *Aeromonas hydrophila* - bactéria abundante na água quando esta é rica em matéria orgânica). Por este motivo, para os alimentos pertencentes ao G3 não se pode formular nenhuma conclusão para os resultados não satisfatórios.

Nos grupos de alimentos G1 e G2 os resultados não satisfatórios deixam uma suspeita relativamente à sua inocuidade. Tal facto deve-se à possível presença de bactérias entéricas patogénicas (exemplo: *Salmonella*), ao armazenamento dos alimentos a temperaturas inadequadas, à contaminação cruzada devido à má higienização das superfícies (equipamentos ou utensílios) e à incorrecta manipulação dos alimentos.

Discussão

Assim, as medidas de controlo que devem ser adoptadas consistem na: adopção de boas práticas de higiene no manuseamento dos alimentos; na aplicação de temperaturas adequadas no processamento e armazenamento dos alimentos; na limpeza e desinfectação dos equipamentos e utensílios.

4.2.4 Contagem de *Escherichia coli*

A frequência absoluta de amostras de alimentos para as quais se efectuou a análise de *E. coli* foi de 1981. Estas foram maioritariamente satisfatórias e aceitáveis enquanto que uma reduzida proporção foi considerada não satisfatória, ou seja, 1903 (96,06%) e 78 (3,94%), respectivamente (Quadro 11). Da análise entre grupos de alimentos verificou-se maior proporção de amostras não satisfatórias para G1 (64,10%). Nenhum alimento de G3 foi classificado como não satisfatório. A análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológica evidenciou diferenças significativas ($p < 0,0001$).

A reduzida proporção de alimentos não satisfatórios (3,94%) não permite formular uma conclusão relativamente à distribuição sazonal da presença de *E. coli* nos alimentos prontos a consumir (Quadro 11).

Uma contagem elevada de *E. coli* tem um significado mais importante na medida em que constitui o melhor indicador fecal, embora a presença simultânea de bactérias patogénicas não seja uma certeza. É por este motivo que é prática comum nos laboratórios pesquisar coliformes totais como teste preliminar. Se o resultado for positivo, prossegue-se com um teste de confirmação de coliformes fecais e, finalmente, a identificação de *E. coli*. Esta sequência não é aplicável aos vegetais crus porque só a *E. coli* é considerada como indicador válido de contaminação fecal. Os resultados não satisfatórios poderão justificar-se pela confecção de pratos com carnes processadas ou cruas as quais poderão apresentar uma contaminação inicial, ou por más práticas de higiene adoptadas pelos manipuladores, por contaminação cruzada a partir das superfícies de contacto dos alimentos, ou ainda por elevadas temperaturas de armazenamento (Christison *et al.*, 2008). Já a inexistência de amostras de alimentos G3 detentores da bactéria a níveis não satisfatórios revela o respeito de boas práticas de higiene pelos manipuladores assim como adequada limpeza e desinfectação dos produtos.

As medidas de controlo a adoptar devem consistir em: tratamento térmico adequado a fim de eliminar os agentes patogénicos (especialmente para alimentos de origem animal) e armazenamento em condições apropriadas de modo a evitar a sua multiplicação (exemplo: arrefecimento rápido do excesso de produção); aplicar cuidados para evitar a contaminação posterior ao processamento ou tratamento térmico (exemplo: arrefecimento rápido da carne a temperaturas inferiores a 7 °C após o abate); não utilizar águas não

Discussão

tratadas na fertilização das culturas para consumo humano nem águas não cloradas na limpeza dos equipamentos e superfícies de contacto dos alimentos; formação dos manipuladores sobre técnicas seguras de manuseamento dos alimentos e higiene pessoal (ICMSF, 1996).

4.2.5 Contagem de *Staphylococcus coagulase-positiva*

A contagem de *Staphylococcus coagulase-positiva* em 1981 amostras de alimentos revelou que estas foram maioritariamente satisfatórias (98,69%) observando-se uma frequência reduzida de não satisfatórias (1,26%) e apenas um alimento inaceitável para G1 (Quadro 12). A análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológica não revelou diferenças significativas ($p=0,3200$).

A análise sazonal não determinou uma relação entre a sazonalidade e o aumento da frequência de resultados não satisfatórios e inaceitáveis, isto é, 1,26% e 0,05%, respectivamente (Quadro 12).

Normalmente, os alimentos envolvidos em intoxicações estafilocócicas são os produtos de pastelaria e cremes (Joffin e Joffin, 2003), carnes cozinhadas, marisco e outros pratos preparados com antecedência relativamente ao consumo (ICMSF, 1996), assim como os queijos e salames de fermentação incorrecta ICMSF, 1996). Na amostra em causa os alimentos não satisfatórios foram, para G1, a açorda de tomate, fatias de carne assada, empadas de atum e de galinha, frango, perna de peru assada com batata corada e laranja, recheio para crepe; rissol de carne e bolos (éclair e russo); para G2, salada de atum, de feijão-frade, de polvo e Tropical e em bolo de chocolate com nozes; para G3, alface, cenoura, tomate cortado, salada mista e salada verde. O alimento inaceitável G1 foi a carne assada e a sua contaminação pode ter ocorrido posteriormente ao tratamento térmico, devido a ruptura na cadeia de frio ou à permanência prolongada à temperatura ambiente (20 °C a 40 °C) (ICMSF, 1996), reduzida higiene dos manipuladores e equipamentos/utensílios inadequadamente higienizados (ICMSF, 1996). Isto poderá também justificar a presença da bactéria a níveis não satisfatórios em alimentos do G1 (10 alimentos) a para os do G2 e G3 pode ainda dever-se ao seu elevado grau de manipulação, deficiente qualidade microbiológica das matérias-primas e reduzidas práticas de higiene dos manipuladores

Nos alimentos anteriormente referidos, *S. aureus* pode desenvolver-se devido à ausência de flora de competição, e produzir enterotoxinas, as quais são resistentes ao tratamento térmico (ICMSF, 1996) e, a sua inactivação pode ser lenta ou não ocorrer durante a preparação, armazenamento e distribuição (Comissão Europeia, 2003). Quando as espécies enterotoxinogénicas atingem nos alimentos números elevados (superiores a

Discussão

10^5 - 10^6 ufc/g) antes da sua eliminação, há risco de intoxicação (Comissão Europeia, 2003; Little *et al.*, 2007) sendo preocupante do ponto de vista da salubridade.

As medidas de controlo que devem ser aplicadas são: armazenamento a temperaturas inferiores a 4.4 °C ou superiores a 60 °C; tratamento térmico adequado dos alimentos e boa higiene pessoal dos manipuladores (Jay *et al.*, 2005).

4.2.6 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Relativamente às amostras de alimentos para as quais foi efectuada a pesquisa de *Salmonella* spp. (1954), apenas uma pertencente a G1 foi classificada como inaceitável (Quadro 13). Esta amostra consistia em “Frango à Brás” cujos ingredientes, possíveis veículos do patogénico, são o frango e os ovos. A análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológica não evidenciou diferenças significativas ($p=0,7080$).

A interpretação dos resultados da distribuição sazonal dos alimentos, para os quais foi detectada a presença deste patogénico, não é conclusiva devido à quase inexistência de resultados inaceitáveis.

A carne de aves é o principal reservatório de *Salmonella* spp. (Mossel *et al.*, 2003; McLauchlin e Little, 2007). Jay *et al.* (2005) mostraram que 42% de carcaças de aves foram positivas para o patogénico. A presença de *Salmonella* spp. nos ovos é rara mas pode estar associada a casos de doença (McLauchlin e Little, 2007). A informação relativa à dose infecciosa é insuficiente, contudo, Bemrah *et al.* (2002) referem que é inferior a 1.2×10^4 células e, McLauchlin e Little (2007) mencionam que, normalmente, está compreendida entre 10^5 e 10^6 células por grama de alimento. É relevante o facto de existir um alimento inaceitável e, tanto mais por pertencer ao G1. Isto indica que o tratamento térmico a que foi submetido foi ineficaz na inactivação e eliminação da bactéria (Bemrah *et al.*, 2002). As possíveis justificações são: conduta indevida ao longo da cadeia alimentar, em geral, uma ruptura na cadeia do frio, contaminação cruzada durante o processamento entre alimentos crus e cozinhados e entre estes e os equipamentos e utensílios ou mãos de manipuladores (portadores assintomáticos) (Bemrah *et al.*, 2002; Mesquita, 2006). Os alimentos mais frequentemente envolvidos são os ovoprodutos, as carnes e aves domésticas, a carne picada indevidamente cozinhada (preocupante), o leite, o peixe, ostras e outros moluscos marinhos (Joffin e Joffin, 2003; Marriott e Gravani, 2006; Leyral e Vierling, 2007).

O controlo de *Salmonella* spp. pode ser efectuada através da implementação de medidas preventivas em toda a cadeia produtiva, isto é, a nível da produção animal, devem ser adoptadas adequadas práticas de higiene no abate e restante processamento das carnes assim como na etapa final de produção (EFSA, 2006; Mesquita, 2006). Estas

Discussão

medidas devem ainda ser aplicadas de modo a: eliminar o agente patogénico através de factores como a temperatura, a irradiação, a acidificação de modo isolado ou combinado; prevenir a contaminação de alimentos prontos a consumir; e, prevenir o crescimento pelo armazenamento a temperaturas reduzidas ou elevadas (ICMSF, 1996).

4.2.7 Pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes*

No total de 1109 amostras de alimentos para as quais foi pesquisada a presença de *L. monocytogenes*, a maioria, independentemente do grupo, revelou-se satisfatória (97,75%), enquanto que apenas 25 destas foram inaceitáveis (2,25%). A análise das frequências relativas entre grupos de alimentos e níveis de qualidade microbiológica não evidenciou diferenças significativas ($p=0,5539$).

A análise sazonal não é conclusiva devido à reduzida proporção de amostras de alimentos inaceitáveis (2,25%) (Quadro 14).

Os resultados são explicados devido ao facto de ser uma bactéria que pode estar presente nos alimentos frescos de origem animal ou vegetal, em doses reduzidas [produtos lácteos (leite cru, queijos de pasta mole não pasteurizados), produtos cárneos (frango cozido e produtos de charcutaria), produtos vegetais, saladas, peixe e marisco e ovoprodutos) (Marriott e Gravani, 2006; Vierling e Leyral, 2007). A contaminação dos alimentos G1 pode ser justificada pelo desrespeito das boas práticas de higiene em qualquer etapa do processamento alimentar, especialmente a cadeia de frio, pela ocorrência de contaminação cruzada com alimentos de diferente natureza ou pelos equipamentos e utensílios nos quais aderem e sobrevivem. Relativamente aos alimentos G2 a contaminação, além do anteriormente referido, deve-se ao reduzido grau de processamento e elevada manipulação. A contaminação de alimentos do G3 pode ser justificada por práticas incorrectas de limpeza e desinfecção dos produtos e uso de matérias-primas de reduzida qualidade higiénica. Do ponto de vista da saúde pública os alimentos inaceitáveis (G1 – Arroz de peixe, Coxinhas de galinha, Frango, Ovo cozido, *Rigatoni* com salmão, Rissóis de carne e de camarão, Salgado de galinha, Vitela assada, Bolo de chocolate; G2 - Pasta de camarão, de delícias do mar, de frango e de caranguejo; *Cheesecake*; *Mousses de caramelo*; G3 – Salada mista, Verde; vegetais; Salada de fruta; Gelado de morango) são considerados prejudiciais pois, para indivíduos saudáveis, a ocorrência de listeriose deve-se ao consumo de elevada quantidade de bactérias ($> 10^5/g$) (Vierling e Leyral, 2007). No entanto, para os indivíduos dos grupos de risco (crianças, idosos, grávidas e imunodeficientes) uma dose de 1 a 100 células pode ser suficiente à ocorrência de infecção (Butt *et al.*, 2004; Marriott e Gravani, 2006).

As medidas de controlo devem ser aplicadas inicialmente a nível da produção primária e prolongarem-se ao processamento e manuseamento dos géneros alimentícios

Discussão

até ao consumidor (exemplo: aplicação de um sistema *Hazzard Analysis e Critical Control Points* (HACCP)). Assim, na exploração deve proceder-se à rápida acidificação da silagem e o leite deve ser armazenado a temperaturas inferiores a 5 °C até ao transporte. No processamento, devem aplicar-se programas HACCP (para minimizar a multiplicação nos produtos crus), adoptar técnicas para a eliminação da bactéria, minimizar o risco de recontaminação de alimentos prontos a consumir ou forem submetidos a tratamento térmico ou outros, armazenamento dos alimentos a temperaturas inferiores a 5 °C. No retalho deve-se separar alimentos crus de origem animal dos alimentos prontos a consumir; aplicar métodos de limpeza e desinfeção dos equipamentos e em intervalos adequados; armazenar a temperatura adequada (<5°C) e monitorizar a validade do alimento (ICMSF, 1996).

Conclusões

5. Conclusões

A partir da análise e discussão dos resultados obtidos neste estudo pode verificar-se que a maioria é consentânea com a bibliografia consultada.

O estudo realizado no âmbito do presente trabalho, sobre a análise microbiológica de alimentos prontos a comer, conduziu às seguintes conclusões:

1. Na generalidade, a maioria dos alimentos, independentemente do grupo ao qual pertenciam, possuíam uma qualidade microbiológica satisfatória e aceitável.
2. As bactérias *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* foram isoladas em alimentos com níveis inaceitáveis. Apesar da proporção de resultados positivos ter sido baixa, não deixam de constituir um risco para a saúde pública.
3. A análise sazonal revelou que os alimentos para os quais foi detectada a presença de microrganismos aeróbios mesófilos totais, bolores, leveduras e coliformes totais ocorreram principalmente no segundo e terceiro trimestres. As diferenças foram significativas para alimentos do G1 e G3, do G1 e G2 e do G1, G2 e G3 para bolores, leveduras e coliformes totais, respectivamente. Esta diferença poderá estar associada às temperaturas mais elevadas nesta época do ano.

A caracterização microbiológica dos alimentos é útil pois quando participada aos responsáveis dos estabelecimentos do sector alimentar fornece informação quanto ao estado de higiene e segurança dos alimentos que produzem. Assim, permite-lhes avaliar e monitorizar todas as etapas do processamento e, caso seja necessário, aplicar medidas correctivas de modo a produzir alimentos de qualidade e seguros para os consumidores.

Futuramente seria interessante efectuar um estudo que avaliasse o estado da higiene das superfícies de contacto alimentar e dos manipuladores dos diferentes tipos de estabelecimentos de restauração. O objectivo seria averiguar a sua influência na qualidade microbiológica dos alimentos prontos a consumir.

Bibliografia

6. Bibliografia

Agata N., Ohta M. e Yokoyama K. (2002). Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 23-27.

Alves N. C., Odorizzia A. C. e Goulartb F. C. (2002). Microbiological analysis of mineral water and drinking water of reservoir supplies, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 36: 749-751.

Arnesen L. P. S., O'Sullivan K e Granum P. E. (2006). Food poisoning potential of *Bacillus cereus* strains from Norwegian dairies. *International Journal of Food Microbiology*. 116: 292-296.

Banerjee M. e Sarkar P. K. (2003). Microbiological quality of some retail spices in Índia. *Food Research International*, 36: 469-474.

Banerjee M. e Sarkar P. K. (2004). Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. *Food Control*, 15: 491-496.

Banerjee M., Sarkar P. K. (2004). Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic micro-organisms from spices. *Food Microbiology*, 21: 335-342.

Barros M. A. F., Nero L. A., Monteiro A. A. e Beloti V. (2007). Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 27: 856-862.

Bemrah N., Bergis H., Colmin C., Beaufort A., Millemann Y., Dufour B., Benet J. J., Cerf O. e Sanaa M. (2003). Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 80:17-30.

Bolton D. J., Meally A, Blair I.S., McDowell D. A. e Cowan C. (2008). Food safety knowledge of head chefs and catering managers in Ireland. *Food Control*, 19: 291-300.

Bibliografia

Brynstad S. e Granum P. E. (2002). Clostridium perfringens and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 195-202.

Butt A. A., Aldridge K. E. e Sanders C. V (2004). Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 4: 201-212.

Carlin F., Fricker M, Pielaat A., Heisterkamp S, Shaheen R, Salonen M. S., Svensson B., Nguyen-the C. e Ehling-Schulz M. (2006). Emetic toxin-producing strains of Bacillus cereus show distinct characteristics within the Bacillus cereus group. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 132-138.

Christison C. A., Lindsay D. e von Holy A. (2008). Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Food Control*, 19: 727-33.

Codex Alimentarius Commission (1993). *Code of hygiene practice for precooked and cooked food in mass catering*. 39.

Dierick K, Van Coillie E. V., Swiecicka I., Meyfroidt G, Devlieger H., Meulemans A., Hoedemaekers G., Fourie L., Heyndrickx M. e Mahillon J. (2005). Fatal family outbreak of Bacillus cereus-associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 4277-4279.

Dunkley K.D., Callaway T. R., Chalova V. I., Anderson R. C., Kunding M. M., Dunkley C. S., Nisbet D. J. e Ricke S. C. (2008). Growth and genetic responses of Salmonella Typhimurium to pH-shifts in an anaerobic continuous culture. *Anaerobe*, 14: 35-42.

Comissão Europeia (2003). Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on Staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses.

European Food Safety Authority (2007). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006.

Forsythe S. J. (2002). *Microbiologia da Segurança Alimentar*. 1ª edição, Artmed. Porto Alegre.

Bibliografia

García-Almendárez B. E., Cann I. K. O., Martin S. E., Guerrero-Legarreta I e Regalado C. (2008). Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19: 670-680.

Godoy P., Artigues A., Nuin C., Aramburu J. e Perez M. (2002). Outbreak of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni* transmitted through drinking water. *Medicina Clínica*, 119: 695-698.

Hakalehto E., Pesola J., Heitto L., Närvänen A. e Heitto A. (2007). Aerobic and anaerobic growth modes and expression of type 1 fimbriae in *Salmonella*. *Pathophysiology*, 14: 61-69.

Hoffmann S., Fischbeck P., Krupnick A e McWilliams M. (2008). Informing risk-mitigation priorities using uncertainty measures derived from heterogeneous expert panels: A demonstration using foodborne pathogens. *Reliability Engineering & System Safety*, 93: 687-698.

Hughes C., Gillespie I.A. e O'Brien S. J. (2007). Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. *Food Control*, 18: 766-772.

Hui Y. H., Pierson M. D. e Gorham J. R. (2001). *Foodborne disease handbook - Volume 1: Bacterial pathogens*. 2ª edição, Marcel Dekker. New York.

Ikeda I., Tamate N., Yamaguchi K. e Makino S. (2005). Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2793-2795.

International Commission of Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), (1996). *Microorganisms in Foods 5 - Microbiological Specifications of Food Pathogens*. Blackie Academic & Professional. New York.

James C, James S. J., Hannay N., Purnell G., Barbedo-Pinto C, Yaman H., Araujo M, Gonzalez M. L., Calvo J, Howell M. e Corry J. E. L. (2007). Decontamination of poultry carcasses using steam or hot water in combination with rapid cooling, chilling or freezing of carcass surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 195-203.

Jay J. M., Loessner M. J. e Golden D. A. (2005). *Modern food microbiology*. ISBN 0387231803. 7ª edição, Springer Science + Business Media. New York.

Bibliografia

Joffin C. e Joffin J. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Collection Biologie Technique. 5^a edição, Scérén. Saint-Denis.

Juneja V. K. e Marks H. M. (2006). Growth kinetics of *Salmonella* spp. pre- and post thermal treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 54-59.

Kérouanton A., Hennekinne J. A., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A. e De Buyser M. L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 369-375.

Keto-Timonen R., Nevas M. e Korkeala H. (2005). Efficient DNA Fingerprinting of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 1148–1154.

Kiseon H., Jang S. S., Choo E., Heu S. e Ryu S. (2007). Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 50-59.

Kirby R. M., Bartram J. e Carr R. (2003). Water in food production and processing: quantity and quality concerns. *Food Control*, 14: 283-299.

Kiss R., Tirczka T., Szita G., Bernáth S. e Csikó G. (2006). *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis in Hungary, 2004. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 71-74.

Lacasse, D. (1995). *Introduction à la Microbiologie Alimentaire*. Les Éditions Saint-Martin.

Lacasse D. (2000). *Introdução à microbiologia alimentar*. 1^a edição, Instituto Piaget. Lisboa.

Le Loir Y., Baron F. e Gautier M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2: 63-76.

Lin Y. e Labbe R. (2003). Enterotoxigenicity and Genetic Relatedness of *Clostridium perfringens* Isolates from Retail Foods in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1242-1246.

Bibliografia

Little C. L., Rhoades J. R., Sagoo S. K., Harris J., Greenwood M., Mithani V., Grant K. e McLauchlin J. (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*, 25: 304-312.

Lopes M., Galhardo J. A., Oliveira J. T., Tamanini R., Sanches S. F. e Muller E. E. (2007). Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 28: 465-476.

Lukinmaa S., Takkunen E. e Siitonen A. e (2002). Molecular Epidemiology of *Clostridium perfringens* Related to Food-Borne Outbreaks of Disease in Finland from 1984 to 1999. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3744-3749.

Marriott N. G. e Gravani R. B. (2006). *Principles of food sanitation*. 5ª edição, Birkäuser.

Martínez S., Borrajo R., Franco I. e Carballo J. (2007). Effect of environmental parameters on growth kinetics of *Bacillus cereus* (ATCC 7004) after mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 223-227.

McClane B. A. e Chakrabarti G. (2004). New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxina. *Anaerobe*, 10: 107-114.

McEvoy J. M., Doherty A. M., Sheridan J. J., Thomson-Carter F. M., Garvey P., McGuire L., Blair I. S. McDowell D. A. (2003). The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 256-266.

McLauchlin J. e Little C. (2007). *HOBBS' food poisoning and food hygiene - Hygiène et sécurité alimentaires*. 7ª edição, Hodder Arnold. Londres.

McMeekin T. A., Baranyi J., Bowman J., Dalgaard P., Kirk M., Ross T., Schmid S. e Zwietering M. H. (2006). Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 181-194.

Mesquita M. O., Daniel A. P., Saccol A. L. F., Milani G.L.M., Fries L. L. M. (2006). Qualidade microbiológica no processamento do frango assado em unidade de alimentação e nutrição. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26: 198-203.

Bibliografia

Miwa N., Masuda T., Kwamura A., Terai K. e Akiyama M. (2002). Survival and growth of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative *Clostridium perfringens* in laboratory media. *International Journal of Food Microbiology*, 72: 233-238.

Mossel D. A. A., Moreno B. e Struijk (2003). *Microbiologia de los alimentos*. 2ª edição, Acribia. Zaragoza.

Normanno G., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N. C., Corrente M., Parisi A., Santagada G., Firinu A., Crisetti E. e Celano G. V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 290-296.

Oliveira S. D., Santos L. R., Scuch D. M. T., Silva A. B., Salle C. T. P. e Canal C. W. (2002). Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*, 87: 25-35.

Peles F., Wagner M., Varga L., Hein I., Rieck P., Gutser K., Keresztúri P., Kardos G., Turcsányi I., Béri B e Szabó A. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Applied and Environmental Microbiology*, 118: pp. 186-193.

Ray B. (2004). *Fundamental Food Microbiology*. ISBN 0849316103. 3ª edição, CRC Press. New York.

Regulamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de Novembro. *Jornal Oficial da União Europeia* nº 2212/2005. Comissão Europeia

Samelis J., Sofos J. N., Kendall P. A. e Smith G. C. (2001). Influence of the Natural Microbial Flora on the Acid Tolerance Response of *Listeria monocytogenes* in a Model System of Fresh Meat Decontamination Fluids. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2410-2420.

Santos M. I., Correia C., Cunha, M.I.C., Saraiva, M.M., Novais, M.R. (2005). Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Revista Ordem dos Farmacêuticos*. Ano XII. 66-68.

Sargeant J. M., Rajic A, Read S. e Ohlsson A. (2006). The process of systematic review and its application in agri-food public-health. *Preventive Veterinary Medicine*, 75: 141-151.

Bibliografia

Soares C. M. (2004). *Bacillus cereus* produtores de toxinas diarreicas em serviços de alimentação: análise da contaminação ambiental e detecção na linha de processamento de pratos cárneos. Campinas.

Soares E. (2007). Doenças de origem alimentar. Infecções e intoxicações. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 2: 6-8.

Sofos J. N. (2007). Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Science*, 78: 3-13.

Todd E. C. D. (2004). Microbiological safety standards and public health goals to reduce foodborne disease. *Meat Science*, 66: 33-43.

Trachoo N. (2003). Biofilms and the food industry. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 25 (6): 807-815.

Valero M., Hernández-Herrero L. A., Fernández P. S. e Salmerón M. C. (2002). Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiology*, 19: 491- 499.

Van Coillie E., Werbrouck H., Heyndrickx M., Herman L. e Rijpens N. (2004). Prevalence and Typing of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Food Products on the Belgian Market. *Journal of Food Protection*, 67: 2480-2487.

Vierling E. e Leyral G. (2007). *Microbiologie et toxicology des aliments - Hygiène et sécurité alimentaires*. 4^a edição. Doin.

Vitas A. I., Aguado V. e Garcia-Jalon I. (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 90: 349-356.

Walls I. e Buchanan R. L. (2005). Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. *Food Control*, 16: 795-799.

Wijnands M. L., Dufrenne B. J., Zwietering H. M. e Leusden M. F. V. (2006). Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastrointestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 120-128.

Bibliografia

Webgrafia:

World Health Organization (2000). Campylobacter. Acedido em Janeiro de 2008, em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>

World Health Organization (2005). Drug-resistant Salmonella. Acedido em Janeiro de 2008, em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>

World Health Organization (2005). Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC). Acedido em Janeiro de 2008, em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/index.html>

World Health Organization (2007). Food safety and foodborne illness. Acedido em Abril de 2009, em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>

World Health Organization (2008). Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control. Acedido em Abril de 2009, em: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/outbreak_guidelines.pdf

ANEXO 1

Anexo 1

Gêneros de bactérias, bolores e leveduras detectados com maior frequência em carnes frescas e carnes de aves domésticas

Quadro 1. Gêneros de bactérias mais frequentemente encontradas em carnes frescas e carnes de aves domésticas

Gênero	Carnes Frescas	Carne de Aves Domésticas	Gênero	Carnes Frescas	Carne de Aves Domésticas
<i>Acinetobacter</i>	XX	XX	<i>Lactobacillus</i>	X	
<i>Aeromonas</i>	XX	X	<i>Lactococcus</i>	X	
<i>Alcaligenes</i>	X	X	<i>Leuconostoc</i>	X	
<i>Arcobacter</i>	X		<i>Listeria</i>	X	XX
<i>Bacillus</i>	X	X	<i>Microbacterium</i>	X	X
<i>Brochothrix</i>	X	X	<i>Micrococcus</i>	X	XX
<i>Campylobacter</i>		XX	<i>Moraxella</i>	XX	X
<i>Carnobacterium</i>	X		<i>Paenibacillus</i>	X	X
<i>Caseobacter</i>	X		<i>Pantoea</i>	X	X
<i>Citrobacter</i>	X	X	<i>Pedicoccus</i>	X	
<i>Clostridium</i>	X	X	<i>Proteus</i>	X	X
<i>Corynebacterium</i>	X	XX	<i>Pseudomonas</i>	XX	XX
<i>Enterobacter</i>	X	X	<i>Psychrobacter</i>	XX	X
<i>Enterococcus</i>	XX	X	<i>Salmonella</i>	X	X
<i>Erysipelothrix</i>	X	X	<i>Serratia</i>	X	X
<i>Escherichia</i>	X		<i>Shewanella</i>	X	
<i>Flavobacterium</i>	X	X	<i>Staphylococcus</i>	X	X
<i>Hafnia</i>	X		<i>Vagococcus</i>		XX
<i>Kocuria</i>	X	X	<i>Weissella</i>	X	
<i>Kurthia</i>	X		<i>Yersinia</i>	X	

Nota: **X**: ocorrência; **XX**: frequentemente detectadas

Adaptado de Jay *et al.*, 2005

Quadro 2. Gêneros de Bolores detectados com maior frequência em carnes frescas e carnes de aves domésticas

Gênero	Carnes Frescas e Refrigeradas	Carne de Aves Domésticas
<i>Alternaria</i>	X	X
<i>Aspergillus</i>	X	X
<i>Aureobasidium</i>	X	
<i>Cladosporium</i>	XX	X
<i>Eurotium</i>	X	
<i>Fusarium</i>	X	
<i>Geotrichum</i>	XX	X
<i>Monascus</i>	X	
<i>Monilia</i>	X	
<i>Mucor</i>	XX	X
<i>Neurospora</i>	X	
<i>Penicillium</i>	X	X
<i>Rhizopus</i>	XX	X
<i>Sporotrichum</i>	XX	
<i>Thamnidium</i>	XX	

Nota: X: ocorrência; XX: frequentemente detectadas

Adaptado de Jay *et al.*, 2005

Quadro 3. Gêneros de Leveduras mais frequentemente encontradas em carnes frescas e carnes de aves domésticas

Gênero	Carnes Frescas e Refrigeradas	Carne de Aves Domésticas
<i>Candida</i>	XX	XX
<i>Cryptococcus</i>	X	X
<i>Debaryomyces</i>	X	XX
<i>Hansenula</i>	X	
<i>Pichia</i>	X	X
<i>Rhodotorula</i>	X	XX
<i>Saccharomyces</i>		X
<i>Torulopsis</i>	XX	X
<i>Trichosporon</i>	X	X
<i>Yarrowia</i>		XX

Nota: **X**: ocorrência; **XX**: frequentemente detectadas
Adaptado de Jay *et al.*, 2005

ANEXO 2

Anexo 2

Constituição da amostra utilizada no estudo

Quadro 1. Números de amostras de refeições pertencentes a G1 presentes na amostra

Refeições	Número de amostras
Abrótea assada com batata corada; Abrótea estufada	2
Açorda	7
Alas de maruca vidrada	1
Alheira cozinhada com ingredientes cozinhados	3
Almofada	1
Almôndegas com ingredientes cozinhados	3
Amêijoas à Bulhão Pato	1
Argolinhas do Rogil	1
Arroz cozinhado com ou sem ingredientes cozinhados adicionados	39
Atum com massa <i>Fusili</i>	1
Bacalhau (à Brás; à Florentina; à Gomes de Sá; a Lafões; com grão e batata; com legumes; com natas; Espiritual; Gratinado; Caras de bacalhau com hortaliça; Meia desfeita; folhado; à Zé do Pipo)	38
Batata frita caseira "palha"	1
Bifana (simples; frita com arroz de tomate; com arroz)	3
Bife (vaca, peru, frango, de porco com arroz e batata; de porco com cebolada com arroz; raspado com arroz; vitela grelhado com arroz branco e feijão verde salteado; de frango grelhados com esparguete; grelhados com migas de coentros)	19
Bifinhos de cebolada com batata cozida; Bifinhos de peru com arroz manteiga	2
Bitoque	3
Bobó	1
Bocata	2
Bolonhesa (de atum; de carne)	11
Cação (de coentrada; frito com açorda)	4
Calamares com arroz de cenoura	1
Caldeirada de peixe	1
Camarão cozido	6
Carapaus fritos com ou sem arroz	2
Caras de bacalhau com hortaliça	1
Caril de lulas com arroz branco	1
Carne assada (simples; com batata corada e lombardo estufado)	12
Carne com molho à café	1
Carne de empadas	5
Carne (de vaca; peru; porco)	7
Carne de porco assada (simples; com batata assada e tomate; com arroz; com lombarda e batatinha;)	4
Carne de porco (com batata aos cubos; com cogumelos; estufada com batata frita)	4
Carne de porco à portuguesa	6
Carne de vaca (à "morango" com arroz; à Bordalesa com arroz; à	6

Rio Tinto; com batata corada e feijão verde; com pimento; estufada com arroz)	
Carne (estufada com ervilhas; guisada; na frigideira)	3
Carrilheira de porco preto	1
Chamuça	6
Cherne no forno	1
Chile de carne	1
Choco (estufado com batatas e ervilhas; grelhados com batata e legumes)	2
Chop-suey de frango; Chow-min de legumes	2
Codornizes	1
Coelho simples ou com arroz	2
Cogumelos (com natas; gratinados)	3
Corvina (cozida; grelhada com batata cozida, couve-flor e cenoura; vidrada)	3
Costeleta (de porco com ou sem arroz; com batata e legumes cozidos)	4
Coxa de frango ou galinha (grelhada; com cerveja)	5
Cozido à Portuguesa	1
Creme de camarão; Creme de cogumelos e espinafres	7
Crepe	7
Croquetes	20
Delicias (de frango; do mar; de "Verão")	3
Dobrada (com feijão branco)	2
Empada ("Aussi Rules"; de atum; de frango; de galinha; de galinha com cogumelos; de pato; de vitela)	38
Empadão (simples; de arroz; de arroz com legumes; de atum; de carne; de frango com arroz)	20
Entrecosto (à Padeiro; assado no forno; com arroz e batatas fritas; no forno com arroz e batata)	4
Escalope (fritos; de vitela grelhados com arroz e couve de Bruxelas)	3
Esparguete com vitela estufada	1
Espetada de peru com arroz de ervilhas	1
Espinafres cozidos passados	5
Favas com entrecosto	2
Febras simples; grelhadas com arroz)	3
Feijão guisado com arroz e legumes	1
Feijão Tropeiro	1
Feijoada (à Transmontana; com arroz branco; de choco com ou sem arroz)	22
Filetes	2
Filetes de frango	2
Filetes de peixe com arroz alegre, de tomate, ervilhas ou legumes; Filetes de pescada dourados com salada russa	6
Folhado (de camarão; de carne; de cogumelos; de queijo; misto; de salsicha;	33
Frango (à Alentejana com arroz branco; à Brás; à passarinho; à Provençal; assado com ou sem arroz e/ou batata frita; assado com puré de cenoura; de caril com ou sem arroz; com ervilhas; cozido desfiado; de fricassé; de receita original; estufado com molho camarão; triturado com especiarias e malagueta; peito e perna)	57

Frigideira	1
Fritada de carne com arroz	1
Gamba	1
<i>Goulash</i> à Húngaro	5
Grão com mão de vaca e arroz	1
Grelhada mista com arroz de pimentos	1
Hambúrguer de aves confeccionado; Hambúrguer grelhado com esparguete	2
Jardineira (simples; de borrego; de choco; de frango; de porco; de vaca; de vitela)	8
Lanche (simples; misto; de chouriço e bacon)	10
Lasanha (de carne; de legumes; de espinafres; vegetariana)	6
Leitão (desfiado; trinchado)	2
Lentilhas amarelas	1
Lingueirão à Bulhão Pato	1
<i>Linguini</i> com frango e curgetes	1
Lombinho de peixe gratinados com puré; Lombo de pescada estufado; Lombos de cherne grelhados com arroz	3
Lombo de porco (assado; com ou sem arroz; com batatas e ervilhas; com batatas e ervilhas; com couve Bruxelas e batatas; com puré; estufado simples com arroz branco)	12
Lulas (à Algarvia; grelhadas com batata; recheadas)	3
Macedónia	2
Maminha grelhada	1
Maruca cozida com batata e cenoura ou com legumes	2
Massa " <i>Penne</i> "	1
Massa castelar	1
Massa (Chinesa; com atum e grão; de peixe; " <i>Fusilli</i> ")	4
Medalhões de pescada com batata e brócolos	1
Merenda	3
Mil folhas de salmão	1
Milanesa mista	3
Moelas	1
Molho (" <i>Cocktail</i> "; Bolonhesa; Carbonara; de natas, fiambre e cogumelos; de tomate; para francesinhas; " <i>Siciliana</i> ",	11
Ovo cozido	2
Pá de porco (assada)	2
Panados (mistos com espirais e couve portuguesa cozida; de cação com açorda; de porco; guarnecidos)	4
Pão alentejano	2
Pastéis de bacalhau (com arroz de tomate)	14
Pastéis (de carne; de delícias do mar; massa tenra; de espinafres)	9
Pataniscas de bacalhau	4
Pato	2
Peixe (assado no forno; com natas)	2
Peixe-espada (com batata e couve-flor; grelhado com batata, cenoura e brócolos; com legumes e batata)	3
Peixe prata no forno com puré de batata	1
Perca assada no forno	1
Perna de peru assada com batata corada e laranja	1
Perna de porco	1

Pernil (assado)	3
Peru (assado; com esparquete; desfiado)	3
Pescada (com banana; frita com arroz; grelhada com batata e legumes)	3
Picado de carne	1
Picanha	2
Pizza <i>Cheeseham</i> ; "Verão"; de chouriço com queijo e fiambre; "Tropical")	4
Polvo (assado; à Lagareiro)	2
Potras estufadas com arroz branco	1
Prego no pão	1
Pudim de legumes	1
Queijo curado de Alcácer do Sal	1
Queijo fresco	2
Quiche (caseira; de alho francês; de atum; de bacon e queijo; de camarão; de cogumelos; de curgete e salsicha; de espinafres; de fiambre com legumes; de fiambre e ananás; de fiambre e queijo; de fiambre, queijo e bacon; de legumes; de legumes com frango; de legumes e salsicha; de queijo; de queijo, fiambre e cogumelos)	20
Rainha no forno com batata corada	1
Recheio (de camarão; de frango; para chamuças; para crepes)	5
<i>Red fish</i> (assado com ou sem puré; cozido com todos)	3
<i>Rigatoni</i> com Salmão	1
Rissóis (de camarão com ou sem puré de batata; de carne; de marisco com arroz; de peixe)	33
Rojões com batata frita	1
Rolinho (de salsicha; de carne)	2
Rosbife	7
Salada (com mexilhão e camarão; de bacalhau com grão; Russa; Russa de atum)	13
Salgado (" <i>Kibbi</i> "; de galinha)	2
Salmão (gratinado com puré de batata; grelhado com batata cozida)	2
Salsicha (grelhada; toscana)	2
Sardinha assada com batata cozida	1
Seitan estufado com esparquete e legumes cozidos	1
Solha (à delícia com batata cozida e esparregado; estufada com puré de batata)	2
Sopa (de espinafres; de legumes; de peixe; de tomate)	5
Strogonoff (de porco com arroz de sultanas; com arroz simples ou com sultanas)	8
Tarte (de delícias do mar; de espinafres; de espinafres e fiambre; de queijo e fiambre; de requeijão; de requeijão com espinafres; de requeijão e espargos)	8
Tornedó à Itau (com arroz e batata frita; com puré de batata)	2
Tranche de peixe à algarvia com molho de cenoura	1
Trutas no forno com bacon e batata cozida	1
Vitela (simples; à Napolitana com esparquete; à "Rio Tinto" com brócolos e cenoura cozida; assada com ou sem arroz/batata; com cogumelos; cozida com arroz branco e legumes cozidos; estufada com ou sem arroz; com batata e arroz; com cogumelos e puré)	15
TOTAL	773

Quadro 2. Números de amostras de sandes pertencentes a G1 presentes na amostra

Sandes	Número de amostras
Baguete (de atum; de paté de frango)	2
Sandes (de atum; de delícias do mar com maionese; de frango; de leitão; de omeleta de camarão; de panado; de seitan)	13
TOTAL	15

Quadro 3. Números de amostras de bolos pertencentes a G1 presentes na amostra

Bolos	Número de amostras
Bola de Berlim (com creme; com chocolate)	29
Bolas de rum da Jamaica	1
Bolinhos de azeite e aguardente	1
Bolo (brasileiro; brigadeiro; brisa com doce de ovo e amêndoa; de chocolate (com creme de leite); de amendoim; de ananás; de <i>Kiwi</i> ; de morango; de banana; de aniversário; de arroz; de café; de iogurte; de mármore (com coco); de massa folhada; de mel e canela; de mil folhas; de noz (e chocolate); de queque de noz; formigueiro; guardanapo; <i>pabés</i> ; passarinho; bolo-rei; de coco; de manteiga)	48
Bom bocado	1
Bombons (de Óbidos; do Porto)	2
Broas	2
<i>Brownie</i>	1
Castanhas de ovo	1
Crepe de maçã	1
<i>Croissant</i> (com creme de ovos; com chocolate)	5
Delícias de Tomar	1
Donut (simples; com leite condensado)	4
<i>Duchesses</i>	1
Éclair	2
Esses	1
Falafel	1
Fatias douradas	1
Ferradura de ovo	1
Folhado (de chocolate; de maçã)	3
Garibaldi	1
Guardanapo	1
Jesuíta	2
Laços	2
Mil folhas	2
Napoleão	2
Napolitanas de chocolate	1
Palmier simples ou coberto	2
Pastéis (de Belém; de Chaves; de nata; de feijão)	29
Queijada (de amêndoa; de cenoura; de feijão; de gila; de laranja; de leite; de requeijão; de "Pereira")	21

Queque (simples; com passas; de chocolate; de requeijão; de mármore)	5
Quindim	1
Rochas	1
Russo	2
Tarte (de amêndoas; de coco; de maçã; de maracujá; de ovo e canela)	9
Tigelada	2
Torta (simples; de amêndoa; de "Azeitão"; de chocolate; de laranja; de ovos; de coco; de fios de ovos)	12
Tortilha de coco	1
Trança de chocolate	1
Tranche de fios de ovos	2
Travesseiro	1
<i>Waffles</i>	2
TOTAL	209

Quadro 4. Números de amostras de sobremesas doces pertencentes a G1 presentes na amostra

Sobremesas doces	Número de amostras
Aletria	1
Amendoim/Amêndoa com chocolate	2
Arcádia de chocolate	1
Arroz doce	28
Chantilly	8
Cobertura de chocolate branco	1
Cone de baunilha	5
Copo de bolacha pequeno	5
Creme de ovos	14
Creme de pastel	3
Creme de pasteleiro	11
Doce da Casa	3
Doce de ovo	24
Fios de ovos	1
Gelado (de baunilha com ou sem bolacha; de baunilha com caramelo e natas; de café; de chocolate com ou sem bolacha; de doce de leite)	18
Gelatina	2
logurte	1
Leite-creme	8
Maçã (assada; cozida)	3
Marmelada	1
Monte blanco	1
Natas	12
<i>Vouga mole</i>	1
<i>Pana cota</i> (com framboesa)	2
Pêra bêbeda	1
Pipocas	3

Profiteroles	2
Pudim (de caramelo; de gemas; de ovos; de pão; Flan)	14
Puré de maçã	1
TOTAL	177

Quadro 5. Números de amostras de refeições pertencentes a G2 presentes na amostra

Refeições	Número de amostras
Carapau grelhado com salada camponesa	1
Carne de porco assada c batata assada e tomate	1
Costeleta de porco com molho de pickles e arroz	1
Filetes de pescada (com salada e batata; dourados salada camponesa)	2
Maionese de peixe	5
Massa batatada	1
Molho (Caesar, Tártaro)	2
Mousse de frango com castanhas e ginja	1
Mousse de salmão com espargos	1
Orelha de porco com salsa	1
Pasta (de atum; de camarão; de frango; de delícias de frango; de delícias do mar)	44
Pastéis de Bacalhau ultracongelados	1
Pescada dourada com salada batatas com ervilhas	1
Salada (Caesar; Chinesa; de atum com ou sem legumes; de caranguejo; de delícias do mar; de favas com ovo cozido; de feijão-frade; de frango; de grão; de grão com bacalhau; de grão com bacalhau e massa; de legumes variados; de massa com salsa; de legumes variados; de massa de frango; de peixe; de polvo; de queijo fresco; de soja; de tomate e alho francês; fria de frango; fria de milho; "Mediterrânica"; "Oceânica"; "Portuguesa"; "Siciliana"; "Tropical")	58
Salsichas frescas com arroz de ervilha e salada	1
Sushi	4
TOTAL	125

Quadro 6. Números de amostras de sandes pertencentes a G2 presentes na amostra

Sandes	Número de amostras
Baguete "Europa"	1
Clássico; Big Tasty; Cheeseburger; Big Mac; Mc Royal Deluxe; Pita Shoarma	12
Sandes "Italiana Ciabata"; de atum com cenoura, alface e tomate; de fiambre; de frango com salada e maionese; de presunto; de queijo; de queijo e fiambre; "Europa"; mista com alface	24
TOTAL	37

Quadro 7. Números de amostras de bolos pertencentes a G2 presentes na amostra

Bolos	Número de amostras
Bolo (de chantilly com ananás e morango; de chocolate com nozes; de chocolate com nozes; de morango com chantilly)	3
Salame	7
Tarte (de ananás; de maçã enfeitada)	2
TOTAL	12

Quadro 8. Números de amostras de sobremesas doces pertencentes a G2 presentes na amostra

Sobremesas doces	Número de amostras
Baba de camelo	2
Cheesecake (de framboesas; de morango)	4
Delícias de bolacha tricolor	1
Doce do Manel	2
Doce mármore	1
Doce Surpresa	1
Gelado ("Canela"; de ananás; de cheesecake; de framboesas; de frutos do bosque; de iogurte e frutos silvestres; de iogurte natural; de iogurte com amoras; de manga; de melão; de menta; de menta e chocolate; de noz; de pistáchio; de rum com passas; de <i>Stracciatella</i> ; de <i>tangerina</i> ; de <i>Muesli</i>)	24
Gelatinado	1
Geleia de ananás	1
<i>Mousse</i> (com natas e bolacha; de chocolate; de dois chocolates; de caramelo; de iogurte; de manga; de maracujá; de morango; de manga e morango)	80
Natas do Céu	1
<i>Sundae</i> de chocolate	1
Semi-frio de tutti frutti	1
Trufas de chocolate	3
TOTAL	123

Quadro 9. Números de amostras de saladas cruas pertencentes a G3 presentes na amostra

Saladas	Número de amostras
Salada (simples; campestre; com couve-roxa e lombardo; de alface; alface e cenoura; alface e tomate; alface, cenoura e rabanete; de cenoura, couve chinesa e coração; <i>Coleslaw</i> ; de couve e fruta; de couve esquisita; de tomate; de tomate e pepino; de tomate, cebola e salsa; de tomate, pepino e pimento verde; jardineira; mista; <i>mix</i> couve; Verde; Napolitana; Tomate com ervas para salada; tomate cortado com orégãos; tomate e cebola)	83
Salada de frutas	92
Salada de manga e kiwi	1
TOTAL	176

Quadro 10. Números de amostras de vegetais crus pertencentes a G3 presentes na amostra

Vegetais	Número de amostras
Abóbora verde filetes	1
Alface (simples; com cenoura; com tomate)	51
Beterraba	1
Cenoura ralada	85
Coentros	6
Rebentos de soja	2
Salsa	5
Vegetais para crepes	1
TOTAL	152

Quadro 11. Números de amostras de frutos crus pertencentes a G3 presentes na amostra

Frutos crus	Número de amostras
Azeitona	3
Manga cortada	2
Morangos cortados	6
Pepino	1
Pêra	1
Pêssego	1
Rodelas de tomate	1
Tomate (inteiro; cubos; <i>Cherry</i> ; cortado)	164
Tomate cortado e desinfetado	2
TOTAL	181

ANEXO 3

Anexo 3

Produtos que não se enquadram na classificação proposta pelo INSA

Tabela 1. Produtos que não se enquadram na classificação proposta pelo INSA

Produtos não classificados	Quantidade
Bife pojadouro cru e batido	1
Bolo de bolacha	9
Cabaninhas	1
Carapino	1
Casca de laranja	1
Castela	1
Choco (para feijoada; temperado)	2
Chocopam; Chocopast	2
Chouriço	9
Cone <i>stander</i>	5
Doce da neta	1
Fiambre	5
Flocos de coco com rum	1
Gaspacho	1
Gelado (de natas com ou sem chocolate; "Ferrero"; "Haagen Dazs"; de Tiramisu; "Winny")	15
Guacamole	1
Hambúrguer	6
Louro	1
Maionese	11
Massa (folhada; tenra)	2
Massapam	1
Mediterrânica	1
<i>Mix</i> couve (com maionese)	1
Molho ("Mil Ilhas"; de alho; de mostarda; de "Perdiz"; "King"; de carne;	6
Morceia carne	2
Orégãos	1
Ovo partido	1
Ovos crus "Damasovo"	1
Paiola Regional	2
Palhetas de amêndoa	1
Pão casadinho	1
Pasta de açúcar	1
Pasta Europa	1
Pata-roxa fresca	1
Peixe-espada cru	1
Peixe-galo cru	1
Pintainhos	5
Posta de pescada panada congelada	2
<i>Psimissu</i>	1
Salada (com couve, cenoura, cebola e maionese; de alface, cenoura e maionese; de couve e cenoura com maionese; "Montanhosa"; "Ranch")	5
Salmão fresco	5
Salpicão	2

Salsicha para churrasco	2
Sandes "Naturalista"	1
"Spring Dream"	3
Tabina	1
Tarte de natas	1
Tiramisu	3
Tomate com queijo fresco	1
Tremoço	1
Trigo Sarraceno	1
<i>Tutti fish</i>	1
TOTAL	134

ANEXO 4

Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração

Introdução

Alguns microrganismos contribuem de forma benéfica no processamento, na segurança e na qualidade de certos produtos alimentares. Contudo, muitos microrganismos estão envolvidos em processos que causam efeitos indesejáveis nos próprios alimentos, ou na saúde dos consumidores, levando quer à deterioração, quer à ocorrência de doenças de origem alimentar. Estas doenças podem ser agudas ou crónicas, envolvendo não só o aparelho digestivo, mas também os sistemas nervoso, circulatório, urinário e respiratório. A vigilância microbiológica

dos alimentos prontos a comer corresponde a uma área de grande interesse em Saúde Pública, tendo por objectivo assegurar a inocuidade e a salubridade dos alimentos e actuar na prevenção das doenças de origem alimentar.

Por razões relacionadas com a amostragem, metodologia e distribuição dos microrganismos na matriz, a análise microbiológica, por si só, não garante a segurança de um produto final analisado. A segurança dos produtos alimentares é garantida pela implementação de medidas preventivas, tais como o cumprimento de Boas Práticas de Fabrico e a aplicação do Sistema

de Identificação de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP), constituindo as análises microbiológicas uma parte do sistema.

Tipos de critérios microbiológicos

Na criação de um critério, deve ter-se em atenção os microrganismos patogénicos e/ou suas toxinas, os microrganismos de alteração e os microrganismos indicadores, os quais estão dependentes, não só do tipo de produto alimentar e do tipo de amostra colhida, mas também do momento da amostragem.

Tabela 1 – Grupos de alimentos prontos a comer

Grupo	Produto	Exemplos
Grupo 1	Refeições/Sandes/Bolos/Sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT e de maionese industrializada.	Feijoada Pizza Bacalhau à Brás com salsa previamente processada Salada de batata com maionese industrial Pastéis de bacalhau/Croquetes/ Rissóis Sandes de carne assada Sandes de <i>pâté</i> de atum (maionese industrial) Omeleta de Queijo /fiambre <i>Mousse</i> de chocolate instantânea Bolo de chocolate Arroz doce com ou sem canela Gelatinas Salada de fruta/fruta laminada em calda
Grupo 2	Refeições/Sandes/Bolos/Sobremesas doces cozinhadas adicionadas de ingredientes crus e/ou com flora específica própria	Salada de batata com tomate/alface Salada de feijão frade com atum, salsa e cebola picada ou molho vinagrete Prato de peixe/carne/ovos adicionado de salada de vegetais ou frutos Bacalhau à Brás c/ salsa crua e/ou azeitonas Sandes com carne assada e alface Sandes de fiambre, queijo ou enchidos <i>Mousse</i> de chocolate Pudins com fruta ao natural Salada de fruta em calda adicionada de fruta ao natural
Grupo 3	Saladas/ Vegetais/Frutos crus	Alface Tomate Cenoura Couve roxa Salada de frutas Fruta ao natural laminada Morangos

A interpretação dos resultados analíticos revela-se muitas vezes uma etapa de grande complexidade, quando pretendemos avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos. Recorre-se normalmente a critérios microbiológicos preestabelecidos de três tipos diferentes:

- **Leis e Regulamentos** – são de cumprimento obrigatório, aplicados pelas autoridades nacionais, levando à aplicação de sanções.
- **Especificações Microbiológicas** – revestem a forma de um acordo contratual, são utilizadas em

Quadro 1 – Níveis de qualidade microbiológica

Os termos usados para expressar a qualidade microbiológica nos alimentos cozinhados prontos a comer são:

Satisfatório – os resultados analíticos indicam uma boa qualidade microbiológica.

Aceitável – os resultados analíticos indicam que o produto se encontra dentro dos limites estabelecidos.

Não satisfatório – os resultados analíticos indicam que o produto não satisfaz um ou mais dos valores estabelecidos.

Inaceitável/potencialmente perigoso – Os resultados analíticos indicam a presença de microrganismos patogénicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde. Este resultado deve ser comunicado imediatamente à unidade onde foi detectado, para que sejam tomadas as medidas que permitam corrigir a situação.

Tabela 2 – Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer

Microorganismo	Grupo de alimentos	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável / potencialmente perigoso
Microorganismos a 30°C	1	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
	3	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$>10^6$	NA
Leveduras	1* e 2	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
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	$>10 \leq 10^3$	$>10^3$	NA
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
<i>E. coli</i>	1, 2	<10	NA	≥ 10	NA
	3	≤ 10	$>10 < 10^2$	$\geq 10^2$	NA
<i>Listeria</i> spp.	1, 2 e 3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
Anaeróbios sulfito redutores	1, 2 e 3	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$ #
Patogénios					
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	1, 2 e 3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	1, 2 e 3	$\geq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^5$	$\geq 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	1, 2 e 3	<10	$\geq 10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Salmonella</i> spp.	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g	Presente em 25g $<10^2$ #	-	$\geq 10^2$
<i>Campylobacter</i> spp.	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g

- *- Aplicável em produtos conservados no frigorífico
- # - Equacionado caso a caso
- NA - Não aplicável

trocas comerciais e pretendem garantir a qualidade e segurança do produto até à data limite de consumo.

- **Valores Guia** – constituem linhas de orientação para avaliação da qualidade microbiológica dos produtos. Servem para identificar situações que requerem monitorização, com o objectivo de garantir o cumprimento das Boas Práticas de Fabrico.

A legislação portuguesa é omissa no que se refere à grande maioria dos produtos prontos a comer, existindo para bolos e cremes de pasteleria, leites e produtos à base de leite, entre outros.

Assim, para alimentos prontos a comer, preparados em estabelecimentos de restauração colectiva, é premente a elaboração de Valores Guia para apreciação de resultados analíticos, isto é, limites a partir dos quais as determinações microbiológicas quantitativas e qualitativas permitem qualificar o produto segundo níveis de qualidade/segurança. Este gradiente de classificação irá também permitir pôr em evidência a necessidade de implementação de medidas correctivas posteriores.

Elaboração de Valores Guia

Muito do trabalho que vem sendo desenvolvido, há cerca de 30 anos, pelos Laboratórios de Microbiologia dos Alimentos do INSA (Lisboa e Porto), consta de visitas periódicas a unidades de restauração colectiva, efectuadas por técnicos do INSA sem prévio aviso, no período de confecção/distribuição. Durante as visitas é efectuada a verificação das condições higiénicas ao nível das instalações e manipulação e a colheita de amostras – refeições cozinhadas/saladas/sobremesas. A selecção dos produtos a colher é da responsabilidade do técnico. Quando se trata de refeições mistas, são colhidos todos os componentes constituintes

do prato, na mesma proporção em que se encontram neste. As amostras são retiradas do recipiente em que são servidas ao utente para saco esterilizado, utilizando utensílios também esterilizados. Após colheita, são de imediato colocados em mala auto-refrigerada que garante, durante o transporte ao laboratório, uma temperatura entre 0°C e 4°C.

As dificuldades encontradas para uma correcta avaliação da qualidade microbiológica das amostras que analisamos, dada a lacuna existente de valores de referência, levaram os laboratórios do INSA à elaboração dos Valores Guia que aqui apresentamos. A vasta experiência que advém do facto de analisarmos, anualmente, cerca de 4000 amostras, aliada a referências colhidas de diversos documentos internacionais, permitiu estabelecer quatro níveis de qualidade microbiológica, que vão desde o satisfatório ao inaceitável/potencialmente perigoso. De referir que os níveis estabelecidos reflectem e estão de acordo com a melhoria que se tem vindo a verificar ao longo dos anos nestas unidades, no cumprimento dos programas de pré-requisitos.

Os dados obtidos pelo INSA ao longo dos anos permitem agrupar os alimentos prontos a comer analisados em três grupos diferentes, de acordo com o tipo de ingredientes que entram na sua composição, o tratamento térmico ou outro procedimento que lhe é aplicado. (Tabela 1).

Com base na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, microrganismos indicadores e a presença ou o número de determinados patogénios, obtidos na análise microbiológica, foram estabelecidos quatro níveis de qualidade microbiológica (Quadro 1).

O objectivo desta publicação é, por conseguinte, a divulgação dos Valores Guia estabelecidos (Tabela 2). □

Referências Bibliográficas

- Boer, E.; Beumer, R. R. *Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms*. International Journal of Food Microbiology. Vol. 50 N° 1-2, pp. 119-130, September 1999.
- Bryan, F. L. *L'Analyse des risques – points critiques pour leur maîtrise*. OMS, Genève, 1994.
- Bunning, V. K.; Lindsay, J. A.; Archer, D. L. *Chronic health effects of microbial foodborne disease*. World Health Statistics Quarterly Rapport, OMS, Genève, Vol. 50, N°16, p. 51-58, 1997.
- Jay, J. M. *Modern Food Microbiology*, 5ª ed. Van Nostrand Reinhold, New York, 1996.
- Lund, B. M.; Baird-Parker, T. C.; Gould, G. W. – *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 2000.
- Norma Portuguesa – NP 4129. *Regras gerais para a elaboração de critérios de apreciação dos resultados de análises microbiológicas*, 1994.
- Pitt, J. I. *Moulds and health*. Proceedings "4th World Congress Foodborne Infections and Intoxications". FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses, Berlin, Vol 1, p. 200, June 1998.
- PHLS Advisory Committee for Food and Dairy Products – R. J. Gilbert, J. de Louvois, T. Donovan, C. Little, K. Nye, C. D. Ribeiro, J. Richards, D. Roberts, F.J. Bolton. *Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale*. Communicable Disease and Public Health. Vol. 3 N° 3, pp. 163-167, September 2000.
- Roberts, D.; Hooper, W.; Greenwood, M. *Practical Food Microbiology*. Public Health Laboratory Service, 2ª ed. 1995.
- Snyder, O. P. *Menu HACCP for retail operations*. "4th World Congress Foodborne Infections and Intoxications". FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses, Berlin, Vol 1, pp. 537-541, June 1998.
- Vaman, A. H.; Evans, M. G. *Foodborne Pathogens*. Wolf Publishing Ltd. England, 1991.

M. Isabel Santos*, Cristina Correia*, M. Isabel Campos Cunha**, M. Margarida Saraiva**, M. Rosário Novais*
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – INSA; Centro de Segurança Alimentar e Nutrição – CSAN

*Laboratório de Microbiologia dos Alimentos de Lisboa

**Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Porto