

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



AVALIAÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DO RISCO PRESENTE NAS FRUTAS
MINIMAMENTE PROCESSADAS PRONTAS PARA CONSUMO.

PEDRO JOSÉ ALMAS DA SILVA

ORIENTADORA:
Doutora Marília Catarina Leal Fazeres
Ferreira

2022

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



AVALIAÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DO RISCO PRESENTE NAS FRUTAS
MINIMAMENTE PROCESSADAS PRONTAS PARA CONSUMO.

PEDRO JOSÉ ALMAS DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor António Salvador Ferreira

Henriques Barreto

VOGAIS:

Doutora Marília Catarina Leal Fazer

Ferreira

ORIENTADORA:

Doutora Marília Catarina Leal Fazer

Ferreira

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá

Henriques

2022

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Pedro José Almas da Silva

Título da Tese ou Dissertação: Avaliação e categorização do risco presente nas frutas minimamente processadas prontas para consumo.

Ano de conclusão:

2022

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento:

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

Clínica

Produção Animal e Segurança Alimentar

Morfologia e Função

Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;

Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 29 de novembro de 2022

Assinatura: Pedro José Almas da Silva

Agradecimentos

Agradeço a toda a equipa com quem partilhei a realização desta dissertação, a constante ajuda que obtive e os momentos agradáveis que passei.

À Prof. Doutora Marília Ferreira um grande obrigado pela sua prestável ajuda.

Ao Dr. Luís Garcia pela sua paciência, preocupação e constante partilha de informação, e pela orientação dispensada que tanto contribuiu para terminar esta dissertação.

Aos meus pais, mulher e restante família pelo constante apoio e motivação.

Resumo

Avaliação e categorização do risco presente nas frutas minimamente processadas prontas para consumo.

Atualmente encontramos-nos rodeados de uma imensa quantidade de informação sobre o que é e porque devemos escolher uma alimentação saudável e segura. A origem dos alimentos, o transporte, o modo como são preparados e preservados são etapas cada vez mais importantes na indústria alimentar e que o consumidor também quer conhecer. As exigências impostas às organizações tornaram-se mais rigorosas e a preocupação na área de higiene e segurança dos alimentos aumentou. Nesta conjuntura, a presente dissertação visa apontar questões relativas ao risco associado ao consumo de frutas minimamente processadas, prontas para consumo, tomando como exemplo três bactérias importantes para a saúde pública, *Salmonella*, *E.coli* e *Listeria monocytogenes*. Utilizou-se como referência o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, na aplicação dos procedimentos tendo por base os princípios da análise dos perigos e de pontos de controlo críticos (HACCP) e a implementação de boas práticas de higiene (BPH).

Foram abordados os fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos, os critérios microbiológicos das bactérias em estudo e as alterações que podem ocorrer na fruta devido aos fatores de conservação utilizados. A recolha de informação levou à compilação de dados que pretendem demonstrar o risco presente nas frutas minimamente processadas, prontas para consumo, e a sua relação com as referidas bactérias.

Pretende-se mostrar quais as medidas que será necessário implementar para que a higiene e segurança destes alimentos seja garantida e assim, o seu consumo seguro.

Palavras-chave: segurança alimentar; HACCP; pH; atividade de água; fruta.

Abstract

Evaluation and categorization of the risk present in minimally processed fruits ready for consumption.

Currently, we are surrounded by information about a healthier and safer diet. In this way, the consumer himself became more responsible and concerned with his food and the way it is prepared. The demands placed on organizations have become more stringent and concerns in food hygiene and food safety have increased. At this juncture, the present dissertation aims to study the degree of risk present in the fruit ready to eat, concerning three important bacteria for public health, *Salmonella spp.*, *E.coli* and *Listeria monocytogenes*. To this end, it was necessary to use the Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for food as a reference. In order to validate these criteria, it was essential to guarantee the application of procedures based on the principles of hazard analysis and critical control points (HACCP) and the implementation of good hygiene practices (GHP).

The intrinsic and extrinsic factors of foods, the microbiological criteria of the bacteria under study and the changes that can occur in the fruit due to the conservation factors used, were addressed. Data collection led to the elaboration of tables that intend to demonstrate the risk present in minimally processed ready-to-eat fruits and their relationship with the mentioned bacteria.

It is intended to show what are the necessary measures to establish so that the hygiene and food safety of these foods is guaranteed and their consumption safe.

Keywords: food security; HACCP; pH; water activity; fresh fruits.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE GERAL	VI
ÍNDICE DE GRÁFICOS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS	XII
DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR	1
1. INTRODUÇÃO	3
2. SISTEMA HACCP	6
2.1 GÉNESE	6
2.2 FUNDAMENTO	7
2.3 PRINCÍPIOS DO HACCP	8
3. MICROBIOLOGIA	10
3.1. FATORES QUE AFETAM A MULTIPLICAÇÃO MICROBIANA: FATORES INTRÍNSECOS E EXTRÍNSECOS DOS ALIMENTOS	10
3.1.1. <i>Temperatura</i>	11
3.1.2. <i>Disponibilidade de oxigénio</i>	12
3.1.3. <i>Potencial hidrogeniónico</i>	12
3.1.4. <i>Atividade da água</i>	14
3.2. TEORIA DOS OBSTÁCULOS DE LEISTNER: COMBINAÇÃO ENTRE FATORES INTRÍNSECOS E OS EXTRÍNSECOS	15

3.3. DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS.....	18
4. REGULAMENTAÇÃO.....	25
4.1. CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS CONSTANTES DO REGULAMENTO (CE) N.º 2073/2005	25
4.1.1. <i>Escherichia coli</i>	25
4.1.2. <i>Salmonella</i>	27
4.1.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	28
4.1.4. <i>Outros perigos microbiológicos</i>	30
5. ADITIVOS ALIMENTARES.....	31
5.1 ANTIOXIDANTES	32
5.1.1 <i>Ácido Ascórbico (Vitamina C)</i>	32
6. OBJETIVOS E HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO.....	34
7. MATERIAL E MÉTODOS	35
7.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO.....	36
7.1.1. <i>Amostras</i>	36
7.1.2 <i>Amostras simples de fruta fresca e de mistura de frutas prontas a consumir, utilizando filme alimentar</i>	37
7.1.3 <i>Amostras simples de fruta fresca e de mistura de frutas prontas a consumir, sem utilizar filme alimentar</i>	38
7.1.4 <i>Amostras simples de fruta fresca e mistura de frutas prontas a consumir, banhadas em filme alimentar, com período de vida útil ultrapassado</i>	38
7.2. EQUIPAMENTO DE PH E TEMPERATURA	40
8. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	41
8.1. ESTUDO DAS PROPRIEDADES ORGANOLÉTICAS	41
8.2. PH DAS AMOSTRAS.....	41

8.3. TEMPERATURA DAS AMOSTRAS.....	43
8.4. CLASSIFICAÇÃO	44
9. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	48
9.1. RECOMENDAÇÕES	50
10. CONCLUSÃO	55
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

Índice de Gráficos

GRÁFICO 1 – CONSUMO DIÁRIO DE FRUTA NA UE, 2017 (% DE POPULAÇÃO). FONTE EUROSTAT (2019). NOTA: OS RESULTADOS DA PESQUISA PARA ESTE INDICADOR PARA A REPÚBLICA CHECA, ESTÓNIA E REINO UNIDO SÃO POUCO FIÁVEIS E FORAM EXCLUÍDOS. UNIÃO EUROPEIA (UE-28): ESTIMATIVA DO EUROSTAT.	3
GRÁFICO 2 – CONSUMO DIÁRIO DE VEGETAIS NA UE, 2017 (% DE POPULAÇÃO). FONTE EUROSTAT (2019). NOTA: OS RESULTADOS DA PESQUISA PARA ESTE INDICADOR PARA A REPÚBLICA CHECA, ESTÓNIA E REINO UNIDO SÃO POUCO FIÁVEIS E FORAM EXCLUÍDOS. UNIÃO EUROPEIA (UE-28): ESTIMATIVA DO EUROSTAT.	4
GRÁFICO 3 - VALORES DE PH PARA CADA AMOSTRA DE FRUTA COM E SEM FILME ALIMENTAR.....	42
GRÁFICO 4 - REGISTO DAS TEMPERATURAS DAS TRÊS AMOSTRAS DE CADA FRUTA COM (CF) E SEM FILME (SF) ALIMENTAR.	43

Índice de Figuras

FIGURA 1 - EXEMPLOS DA APLICAÇÃO DA TEORIA DOS OBSTÁCULOS. TRÊS MODELOS DE APLICAÇÃO DA TEORIA DE OBSTÁCULOS. MODELO (A) COM BARREIRAS DE INTENSIDADE IGUAL. MODELO (B) COM BARREIRAS DE INTENSIDADE DIFERENTES. MODELO (C) COM ALIMENTO INICIAL DE ALTO TEOR EM VITAMINAS E NUTRIENTES E BARREIRAS COM INTENSIDADE DIFERENTES.	17
FIGURA 2 - ETAPAS DA PREPARAÇÃO DE FRUTA PARA CONSUMO, MINIMAMENTE PROCESSADA.....	35
FIGURA 3 - AMOSTRA DE MELÃO, EM BAIXO E AO CENTRO (A) E AMOSTRA DE ABACAXI, POR TRÁS, À DIREITA (B), OBTIDAS DE FRUTA MERGULHADA NUM FILME ALIMENTAR DE ÁCIDO ASCÓRBICO, TRITURADA E HOMOGENEIZADA.	37
FIGURA 4 - AMOSTRA DE MISTURA DE FRUTAS (C), OBTIDAS DE FRUTAS MERGULHADAS NUM FILME ALIMENTAR DE ÁCIDO ASCÓRBICO, TRITURADAS E HOMOGENEIZADAS.	37
FIGURA 5 - AMOSTRAS DE MELÃO À ESQUERDA (D), AMOSTRAS DE ABACAXI POR TRÁS (E) E AMOSTRAS DE MISTURA DE FRUTAS À DIREITA (F), TRITURADAS E HOMOGENEIZADAS, SEM USO DE FILME ALIMENTAR..	38
FIGURA 6 - AMOSTRA DE MELÃO (N) PRODUZIDA A 31/07/2018 E ABERTA PARA AVALIAÇÃO NO DIA 07/08/18, PORTANTO, ENCONTRA-SE COM DOIS DIAS EM PERÍODO DE VIDA ÚTIL ULTRAPASSADO; AMOSTRA DE ABACAXI (A1) PRODUZIDA A 31/07/2018 E ABERTA NO DIA 07/08/18, TAMBÉM COM DOIS DIAS EM PERÍODO DE VIDA ÚTIL ULTRAPASSADO; AMOSTRA DE ABACAXI (A2) PRODUZIDA A 02/08/2018 E ABERTA NO ÚLTIMO DIA DO PERÍODO DE VIDA ÚTIL, 07/08/18.	39
FIGURA 7 - AMOSTRA DE MISTURA DE FRUTAS (M1) – CONSTITUÍDA POR ABACAXI, MELOA, MELÃO E UVA, PRODUZIDA A 31/07/2018 E ABERTA NO DIA 07/08/18, PORTANTO, DOIS DIAS COM PERÍODO DE VIDA ÚTIL ULTRAPASSADO. AMOSTRA DE MISTURA DE FRUTAS (M2) – CONSTITUÍDA POR ABACAXI, MELOA, MANGA E UVA, PRODUZIDA A 02/08/2018 E ABERTA NO ÚLTIMO DIA DO PERÍODO DE VIDA ÚTIL, 07/08/18. AMOSTRA DE MISTURA DE FRUTAS (M3) – CONSTITUÍDA POR ABACAXI, MELOA, MANGA E UVA, PRODUZIDA A 02/08/2018 E ABERTA NO ÚLTIMO DIA DO PERÍODO DE VIDA ÚTIL, 07/08/18.	39
FIGURA 8 – MEDIDOR DE BANCADA <i>HANNA INSTRUMENTS</i> , MODELO PH2110 COM OS DOIS SENSORES, UM DE PH E UM DE TEMPERATURA.....	40
FIGURA 9 - MOSTRADOR DO MEDIDOR DE BANCADA DA MARCA <i>HANNA INSTRUMENTS</i> DO MODELO PH2110 COM VALORES EXEMPLO DE PH E DE TEMPERATURA.....	40

Índice de Tabelas

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE DESENVOLVIMENTO (FONTE: FERREIRA ET AL. 2010).....	12
TABELA 2 – RELAÇÃO DOS MICRORGANISMOS COM O OXIGÊNIO E O SEU METABOLISMO (FONTE: FERREIRA ET AL. 2010).	12
TABELA 3 – CLASSIFICAÇÃO DE ALGUNS ALIMENTOS CONFORME O PH E MICRORGANISMOS PASSÍVEIS DE MULTIPLICAÇÃO (FONTE: FELLOWS, 2006).	13
TABELA 4 – VALORES APROXIMADOS DE PH DE ALGUMAS FRUTAS (FONTE: ADAPTADO DE JAY,1992).....	14
TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO DE ALGUNS OBSTÁCULOS E SEUS EXEMPLOS (FONTE: LEISTNER AND GORRIS, 1995).....	16
TABELA 6 - GRUPO 3 – FRUTOS E PRODUTOS HORTÍCOLAS CRUS (FONTE: INSA, 2019).	19
TABELA 7 - ZONAS NO AMBIENTE DE PREPARAÇÃO/DISTRIBUIÇÃO ALIMENTAR (FONTE: INSA, 2019).	20
TABELA 8 - “VALORES-GUIA INSA” - INTERPRETAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA (FONTE: INSA, 2019).	21
TABELA 9 - “VALORES-GUIA INSA” - MICRORGANISMOS PATOGENICOS E TOXINAS EM ALIMENTOS PRONTOS PARA CONSUMO (FONTE: INSA, 2019).	22
TABELA 10 - “VALORES-GUIA INSA” - MICRORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE E DE ALTERAÇÃO EM ALIMENTOS PRONTOS PARA CONSUMO (FONTE: INSA, 2019).....	23
TABELA 11 – CARACTERÍSTICAS DAS 3 BACTÉRIAS EM ESTUDO.	30
TABELA 12 - VALORES DE PH DAS AMOSTRAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO, COM PERÍODO DE VIDA ÚTIL ULTRAPASSADO.	42
TABELA 13 - REGISTOS DE TEMPERATURA EFETUADOS ÀS AMOSTRAS DE FRUTAS COM PERÍODO DE VIDA ÚTIL ULTRAPASSADO.	44
TABELA 14 – CLASSIFICAÇÃO DE RISCO DE DESENVOLVIMENTO MICROBIOLÓGICO SEGUNDO O PH.....	45
TABELA 15 - CLASSIFICAÇÃO DE RISCO DE CRESCIMENTO MICROBIOLÓGICO SEGUNDO O A_w	46
TABELA 16 - CLASSIFICAÇÃO DE RISCO DE CRESCIMENTO MICROBIOLÓGICO SEGUNDO A TEMPERATURA.	47
TABELA 17 - PONTOS CRÍTICOS NO PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTA.	53

Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Siglas

a_w – atividade da água

BPH - Boas práticas de higiene

BPF – Boas práticas de fabrico

BPA - Boas práticas agrícolas

CAC - *Codex Alimentarius Commission*

CE - Comissão Europeia

CO₂ – dióxido de carbono

DAN – Departamento de Alimentação e Nutrição

E. coli - *Escherichia coli*

HACCP - Análise dos perigos e de pontos críticos de controlo

ICMSF - *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

MAP (*modified atmosphere packaging*) – embalagem de atmosfera modificada

NaCl – Cloreto de sódio

spp. – quando referenciado, engloba todas as espécies do género em questão. (ex.: *Salmonella* spp.)

pH – Potencial hidrogeniónico

RTE (*ready-to-eat*) – pronto a consumir

UE - União Europeia

ufc/g – Unidade formadora de colónias por grama

ufg/ml - Unidade formadora de colónias por mililitro

VMA - Valor Máximo Admissível

VMR – Valor Máximo de Referência

WHO/FAO - *World Health Organization/Food and Agriculture Organization*

Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular

A escolha do meu estágio curricular na área de segurança e higiene alimentar teve o intuito de consolidar os meus conhecimentos e aprofundar a minha formação nesta área, tendo concluído com a elaboração da presente dissertação de mestrado. O estágio realizou-se numa empresa que produz e comercializa frutas descascadas, prontas a comer (fruta IV gama), sumos de fruta, purés de fruta, sobremesas e sanduíches, e está sediada no Mercado Abastecedor da Região de Lisboa (MARL).

Durante o estágio as atividades realizadas consistiram na integração da equipa de segurança alimentar, com intervenção ao nível da higiene e boas práticas fabris, apoio no controlo da produção e verificação do cumprimento dos procedimentos de segurança alimentar. Foram realizados controlos pelos vários pontos da linha de produção, desde a receção da mercadoria, à lavagem e desinfeção, preparação, descasque e corte, preparação da rotulagem, embalamento e expedição, garantido os padrões de segurança e higiene estabelecidos. Acompanhei uma auditoria hígio-sanitária, que incluiu a avaliação dos equipamentos de proteção individual (EPI) nas várias etapas de produção, a verificação das condições das instalações, equipamentos e utensílios em toda a linha de produção e identificação das não conformidades e oportunidades de melhoria dentro da fábrica. Supervisei a formação de colaboradores nas respetivas etapas de fabrico e participei em visitas técnicas a outros estabelecimentos. Também tive a oportunidade de aceder a relatórios, onde se identificavam as não conformidades e as medidas corretivas a seguir. Acompanhei procedimentos e instruções de trabalho (registos e confirmação de listas das matérias-primas) e a execução da correção do plano de controlo sanitário, que integrava os aspetos relativos ao controlo de pragas (incluído no plano de controlo de pragas). A diversificação das atividades realizadas durante o estágio constituiu uma mais-valia no meu percurso académico, constituindo, assim, uma enriquecedora experiência pedagógica, permitindo a ligação entre o conteúdo teórico lecionado durante o curso com a prática associada à profissão.

O estágio culminou com a concretização e execução desta dissertação, fortemente incentivado pelo Dr. Luís Garcia, através de conversas em que partilhava conhecimentos e discutíamos os dados disponíveis. Para a realização da dissertação, foi importante pesquisar a regulamentação necessária para a produção de alimentos minimamente processados. Com base no Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005, definiu-se quais seriam os microrganismos relevantes para o estudo e que fatores poderiam influenciar o crescimento ou o desenvolvimento dos mesmos. Discutiu-se o plano que se

pretendia e as áreas de interesse em que a dissertação iria assentar e seguidamente foram estabelecidas as necessidades associadas.

O foco do estágio incidiu no cumprimento das medidas de segurança e higiene que impactam diretamente nos alimentos e acautelando as eventuais causas de incumprimento das mesmas, de forma a agir preventivamente no controlo dos desvios, que poderiam vir a permitir a manifestação de perigos para a saúde pública.

Por fim, esta dissertação quer clarificar a relação que existe entre o crescimento bacteriano e as propriedades intrínsecas das matérias-primas, ou seja, estudar o risco presente na fruta fresca minimamente processada para consumo tendo em conta as bactérias em estudo. Pretende-se que, com os resultados obtidos, a presente dissertação se constitua num instrumento capaz de levantar questões, para posterior estudo, promovendo também desta forma a saúde pública e a higiene e segurança dos alimentos.

1. Introdução

O consumo diário de frutas e legumes faz parte de uma dieta saudável e equilibrada. As frutas e legumes são importantes para uma boa alimentação devido ao seu valor nutricional, e ao facto de contribuírem para a prevenção de doenças crónicas, como por exemplo, a obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e cancro (World Health Organization/Food and Agriculture Organization (WHO/FAO, 2005)).

Neste sentido, o consumo de frutas, vegetais, nozes e grãos, e a redução de sal, açúcar e gorduras são passos importantes para a prevenção de tais doenças. Segundo a WHO/FAO (2005), o consumo diário recomendado de frutas e vegetais é de 400 gramas.

O gabinete de estatísticas da União Europeia (UE), o Eurostat, registou em 2017 que Portugal foi o segundo país da UE onde a população comeu mais fruta diariamente (gráfico 1) e ficou em quarto lugar (gráfico 2) no que toca ao consumo diário de legumes, situando-se acima da média comunitária (Eurostat, 2019)

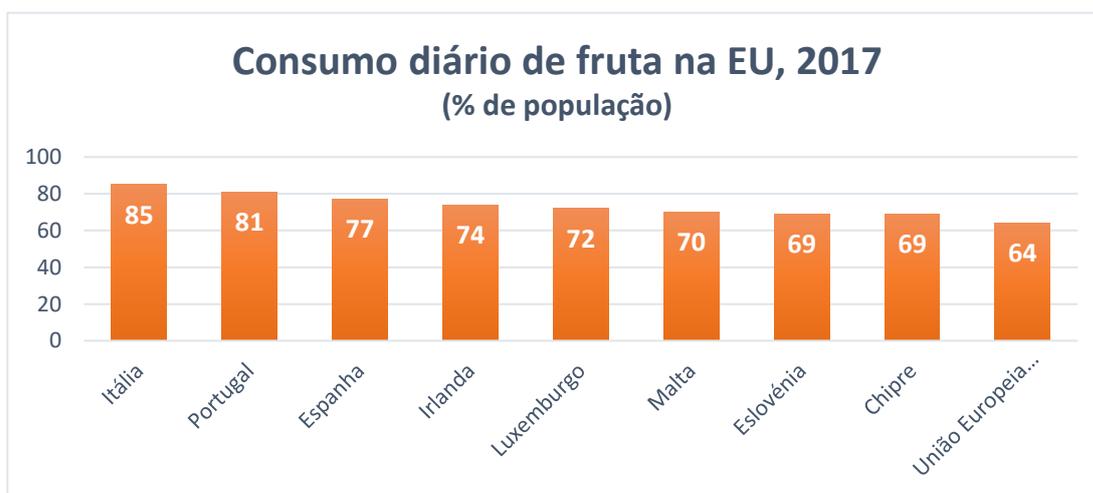


Gráfico 1 – Consumo diário de fruta na UE, 2017 (% de população). Fonte Eurostat (2019). Nota: Os resultados da pesquisa para este indicador para a República Checa, Estónia e Reino Unido são pouco fiáveis e foram excluídos. União Europeia (UE-28): Estimativa do Eurostat.

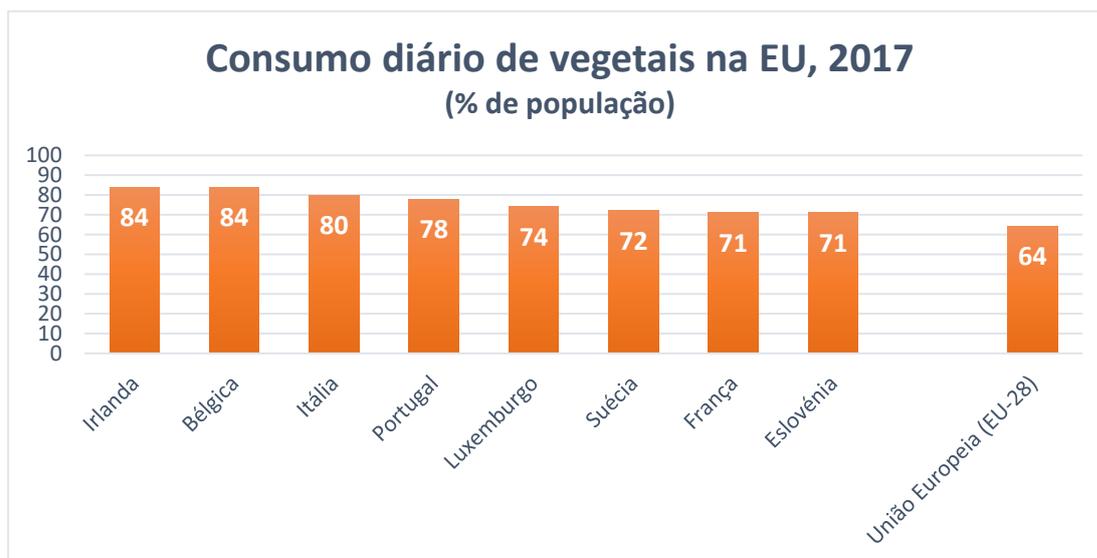


Gráfico 2 – Consumo diário de vegetais na UE, 2017 (% de população). Fonte Eurostat (2019). Nota: Os resultados da pesquisa para este indicador para a República Checa, Estónia e Reino Unido são pouco fiáveis e foram excluídos. União Europeia (UE-28): Estimativa do Eurostat.

Em 2019, de acordo com os últimos dados disponibilizados pelo Eurostat, Portugal aumentou a sua área dedicada ao cultivo de árvores de fruto em 2.500 hectares, correspondendo a um aumento de 7% do que havia sido registado em 2012.

O aumento do consumo de frutas minimamente processadas aponta para problemas na sua qualidade e na segurança dos consumidores. As frutas são provenientes do campo e, até ao seu consumo, enfrentam várias etapas de produção (Bastos 2006).

Um dos principais problemas prende-se com a dificuldade em manter a estabilidade dos produtos desde a produção, passando pelo embalamento, transporte e até à sua disponibilização para o consumidor final. Assim, a preocupação com os aspetos de qualidade e segurança, deve ser condição fundamental no processamento destes produtos caracterizados por um rápido processo de degradação, tanto a nível fisiológico, como microbiológico e bioquímico (Allende et al. 2006; Ragaert et al. 2007).

A necessidade de contrariar a perda de qualidade nutricional e, por outro lado, de promover o aumento do período de vida útil dos produtos são duas variáveis difíceis de controlar e que, naturalmente, irão alterar o produto. O controlo destas variáveis implica a necessidade de compreender os mecanismos de degradação da cor, textura e sabor. Os mecanismos de degradação bioquímica e fisiológica iniciam-se na linha de produção, após a libertação das enzimas, por efeito de ação mecânica durante o descasque, corte, transferência de zona de manipulação. Porventura a degradação mais visível, resulta do efeito

da enzima polifenol oxidase, que provoca o escurecimento, e da enzima lipoxidase, que catalisa as reações de peroxidação, provocando um cheiro desagradável devido aos aldeídos e cetonas produzidos. Também se deteta o aumento da produção de etileno, gás que intervém na maturação da fruta, e, concomitantemente, o mecanismo de degradação devido à atividade microbiana aumenta e vai progredindo ao longo do tempo. Durante o processamento há exposição do produto ao ar, criando assim ótimas condições de acesso para a contaminação por bactérias, leveduras e bolores (Francis and O'Beirne 2001; Ragaert et al. 2007).

Uma forma de prevenir o desenvolvimento destes microrganismos e, por sua vez, aumentar o tempo de vida útil do produto, é através do recurso a embalagem em atmosfera protetora (MAP - *modified atmosphere packaging*). Contudo, esta solução pode levar, por outro lado, ao desenvolvimento de agentes microbiológicos patogénicos de crescimento lento (Rosnes et al. 2003; Chua et al. 2008).

Na linha de produção, quer durante a preparação do produto, quer durante o armazenamento, podem ocorrer quebras na cadeia de frio, não atingindo temperaturas de refrigeração, o que poderá favorecer o desenvolvimento de microrganismos patogénicos psicotróficos, tais como a *Listeria monocytogenes*, a *Aeromonas hydrophila* ou algum tipo de *Clostridium*. Outras espécies como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, alguns vírus e protozoários são responsáveis por levantarem preocupações aos produtores devido às doenças de origem alimentar que provocam. O aparecimento destes microrganismos nos alimentos deve-se, essencialmente, a problemas de contaminação do solo e da água, bem como a práticas inadequadas de higiene (Chua et al. 2008).

O processamento do produto deve realizar-se num ambiente limpo e apropriado, e apoiar-se num sistema de autocontrolo baseado no HACCP; devem estar implementadas Boas Práticas de Fabrico (BPF) e de Higiene (BPH) de modo a prevenir, não só os riscos microbiológicos, como outros possíveis riscos capazes de se desenvolverem.

A presença reduzida de microrganismos patogénicos nos produtos confeccionados pelos operadores de cadeias alimentares é uma obrigatoriedade, sendo regulada através da implementação de sistemas de autocontrolo, com base nos princípios do HACCP tomando em consideração o *Codex Alimentarius*. Estes sistemas têm como principal objetivo a defesa dos consumidores contra possíveis doenças de origem alimentar assegurando a presença de elevados padrões de higiene e, logo, a segurança no consumo dos alimentos produzidos (Novais 2006).

O objetivo principal desta dissertação foi avaliar e categorizar o risco presente nas frutas minimamente processadas prontas para consumo. Este estudo é realizado com base no sistema HACCP, nas BPF e nas BPH, nas características dos microrganismos, nos fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos e na regulamentação atual. A produção das amostras foi feita em conformidade com as práticas e medidas atuais, exceto uma porção das amostras que não foram expostas ao banho alimentar. Procedeu-se à escolha da fruta e sua separação. Posteriormente, foram feitas análises às amostras de modo a obter-se os valores do pH e da temperatura. Os valores da atividade de água, foram obtidos de estudos anteriores. A seguir foram definidas as bactérias a incluir neste estudo e cruzou-se a informação entre os parâmetros das amostras e as características das bactérias. Neste sentido, originaram-se três categorias representativas do risco de contaminação bacteriana para a fruta e delinear-se medidas corretivas e recomendações de forma a evitar o desenvolvimento bacteriano indesejado.

Com o intuito de reduzir os perigos emergentes durante a produção dos alimentos, tendo em conta os aspetos mencionados, encontra-se um sistema que procura identificar e avaliar os riscos durante os processos de produção e identificar os pontos onde pode ocorrer maior risco de contaminação. Este é o sistema HACCP.

2. Sistema HACCP

Apesar dos avanços verificados em termos de segurança dos alimentos, nos últimos anos continuam a existir falhas de higiene e segurança no setor alimentar. Na China, em setembro de 2008, a presença de melamina no leite em pó. Nos Estados Unidos da América (EUA), entre 2008 e 2009, a presença de *Salmonella* na manteiga de amendoim. No Reino Unido, em janeiro de 2006, na marca Cadbury, e no ano de 2017, na marca Mars, a presença de *Salmonella*. Na Alemanha, em 2011, a presença da *E.coli* em sementes germinadas. Estes são apenas alguns exemplos de falhas que têm ocorrido a nível mundial, tal como muitas outras, e por vezes trágicas.

O que falhou nestes casos? Como foi implementado o sistema HACCP? (Wallace and Mortimore, 2013)

2.1 Génese

O sistema HACCP tem por base a identificação, a avaliação e o controlo de perigos para a segurança dos alimentos a consumir e que podem surgir ao longo da cadeia de produção e transformação dos produtos alimentares (CAC 2003a; Baptista et al. 2003).

A implementação do sistema HACCP teve início nos anos 60 do século XX, através da empresa americana Pillsbury em parceria com os laboratórios do Exército dos EUA e com a *National Aeronautics and Space Administration* (NASA). Esta parceria teve como objetivo a produção de refeições 100% seguras para consumo dos astronautas durante as viagens espaciais (Goodrich-Schneider et al. 2005). A partir desse momento desenvolveu-se o sistema HACCP, tendo como base os princípios da microbiologia dos alimentos em combinação com os princípios de controlo de qualidade e de avaliação dos perigos durante a produção de um alimento (Vaz et al. 2000). O sistema de engenharia inicial consistia na análise de falhas, seu modo e efeito (*Failure, Mode and Effect Analysis* - FMEA) e pretendia analisar o que poderia correr mal em cada etapa da operação, juntamente com as possíveis causas e efeitos. Simultaneamente, era prevista a colocação em prática, de mecanismos de controlo que visam impedir ou corrigir potenciais falhas durante o processo. Tal como este sistema inicial FMEA, o HACCP procura e previne o erro, mas no sentido de segurança do produto. De forma a garantir que o produto é seguro e que não pode ser nocivo ao consumidor, são implementadas medidas de controlo preventivo (Wallace and Mortimore, 2013).

No ano de 1980, a OMS, o ICMSF e a FAO, reconheceram a importância e recomendaram a aplicação do Sistema HACCP nas empresas da indústria alimentar (Vaz et al. 2000).

Em 1993, a Comissão do Codex Alimentarius formalizou um guia com as Normas de Aplicação do Sistema HACCP, tendo sido integrado no Código Internacional de Boas Práticas – Princípios Gerais de Higiene Alimentar. Os princípios estabelecidos continuam atuais e são reconhecidos internacionalmente. O sistema HACCP foi adotado pelas indústrias alimentares em geral (Corlett, 1998). O Conselho Europeu publicou a Diretiva 93/43/CEE a 14 de junho de 1993, relativa à higiene dos géneros alimentícios, e implementava a imposição da respetiva utilização, de um modo geral, a todas as empresas do setor (Vaz et al. 2000). A nível nacional, a diretiva foi adotada e transposta para a lei nacional através do Decreto-Lei n.º 67/98, que impôs a aplicação de um sistema de autocontrolo, em todas as empresas do setor alimentar, com base nos princípios HACCP. Mais tarde, esta diretiva foi revogada pelos Regulamentos (CE) n.º 852/2004 e 853/2004. No entanto, foi mantida nestes regulamentos, a necessidade de aplicação do sistema HACCP pelos operadores do setor alimentar.

2.2 Fundamento

O sistema HACCP tem como objetivo a prevenção de perigos que ameacem a saúde e bem-estar dos consumidores, através da análise de perigos e de medidas de controlo

estabelecidas (Marques, 2014). Para uso do sistema HACCP, existe a necessidade de identificar pré-requisitos, de forma que a sua aplicação seja efetiva (Bolton and Maunsell, 2006) e que os mesmos já estejam em execução nas indústrias alimentares como base para boas condições de funcionamento. Estes pré-requisitos compreendem pessoal com formação apropriada, serviços, instalações e equipamentos, localização da unidade industrial e suas infraestruturas. Não obstante, o sistema HACCP tem e deve controlar os perigos associados diretamente nas etapas de produção do produto que possam representar um risco elevado de contaminação (Edwards 2004; Bolton and Maunsell, 2006). O sistema HACCP pode não eliminar eficazmente todos os perigos presentes nas diversas etapas de produção, mas é o melhor método para reduzir possíveis perigos que tenham transposto certas etapas (Schothorst, 2004).

2.3 Princípios do HACCP

O sistema HACCP é fundamentalmente constituído por 12 passos sequenciais, sendo os últimos 7 passos idênticos aos 7 princípios HACCP (Baptista et al. 2003):

1. Constituição da equipa HACCP;
2. Descrição do produto;
3. Identificação do uso pretendido;
4. Construção do fluxograma de fabrico;
5. Confirmação do fluxograma no terreno;
6. Identificação e análise de perigos e identificação de medidas preventivas para o controlo dos perigos identificados (Princípio 1);
7. Determinação de PCC (Princípio 2);
8. Estabelecimento dos limites críticos de controlo para cada PCC (Princípio 3);
9. Estabelecimento do sistema de monitorização para cada PCC (Princípio 4);
10. Estabelecimento de ações corretivas (Princípio 5);
11. Estabelecimento de procedimentos de verificação (Princípio 6);
12. Estabelecimento de controlo de documentos e dados (Princípio 7).

A implementação de um sistema HACCP deve ter como suporte a documentação e os registos das operações que decorrem na produção de um produto. A documentação deve ser desenvolvida por forma a orientar o estabelecimento na aplicação do HACCP e servir como suporte no desenvolvimento de registos que exibam as operações efetuadas e ser validados por um responsável.

Os registos devem ser precisos, eficazes e reveladores de que o plano de HACCP está controlado e se mantém atualizado. O sistema de registos deve ser simples, de forma a ser facilmente aprendido pelos colaboradores (Baptista and Venâncio, 2003).

Apesar das principais razões para a implementação de um sistema HACCP serem o cumprimento legal e a segurança do consumidor, há outros benefícios que a implementação deste sistema acarreta (Vaz et al. 2000):

- Incorpora formalmente os princípios de segurança dos alimentos como passos fundamentais da produção;
- Aumenta a responsabilidade dos trabalhadores no desenvolvimento de alimentos seguros;
- Aumenta a confiança dos consumidores;
- Mantém e aumenta a presença no mercado;
- Reduz o desperdício;
- Permite à indústria alimentar mudar de uma filosofia de controlo do produto final para uma atitude de prevenção;
- Foi aprovado por organizações internacionais como a CAC, que o considera um dos meios mais efetivos de controlar problemas na produção de alimentos seguros;
- O HACCP pode ser usado como prova de defesa em ações legais.

O sistema HACCP é largamente utilizado em ambiente industrial, mas pode perceber-se que é também utilizado em ambiente doméstico. As lavagens dos utensílios, a cozedura dos alimentos, a refrigeração ou congelação dos alimentos, acabam por ser medidas que se usam para eliminar e evitar a contaminação dos alimentos e doenças de carácter alimentar. O próprio produto tornou-se um objeto de estudo. É, assim, evidente o quão importante é estudar o produto em si, como também o que leva à sua deterioração.

3. Microbiologia

Os microrganismos podem estar presentes em qualquer alimento, uma vez que estes são um meio ideal para o seu desenvolvimento. A presença de microrganismos nos alimentos, seja qual for o seu nível de patogenicidade, deve ser analisada de forma a ser possível a qualificação e quantificação dos microrganismos, do risco que o alimento poderá oferecer ao consumidor e de estabelecer a vida útil do alimento (Franco and Landgraf, 2005).

Os microrganismos presentes nos alimentos têm várias origens, incluindo a forma como são cultivados e manipulados. Sabendo que a entrada de microrganismos nos alimentos pode surgir de várias fontes, existe a necessidade de combater e impedir tal entrada, através do uso de vários fatores disponíveis. Será o caso de fatores ambientais que usados corretamente podem retardar ou mesmo eliminar os microrganismos presentes, ou o recurso à manipulação de algumas características presentes nos alimentos. A possibilidade de usar ambos os métodos concomitantemente, cria uma grande margem de segurança ao produto e seu consumo. Assim, as características específicas do alimento, aliadas às condições do meio ambiente envolvente, desencadeiam mudanças no metabolismo dos microrganismos e, naturalmente, promovem ou retardam a sua multiplicação. Tendo em conta que os alimentos têm mecanismos de defesa próprios, a necessidade de conhecê-los e utilizá-los para retardar a multiplicação microbiana são opções válidas para prevenir a alteração e deterioração dos alimentos. Torna-se evidente a necessidade de usar estes mecanismos em nosso proveito na produção de alimentos. Os fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos, são uma ferramenta usada e bem conhecida no mundo da indústria e da produção alimentar (Tondo, 2020).

3.1. Fatores que afetam a multiplicação microbiana: fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos

O que condiciona a qualidade microbiológica dos alimentos é, antes de mais, a quantidade e o tipo de microrganismos que se encontram inicialmente presentes (contaminação inicial), logo seguida da capacidade de multiplicação destes microrganismos no alimento. A contaminação inicial dos alimentos é decorrente da qualidade sanitária das matérias-primas e das condições de higiene a que são sujeitas (dos ambientes, superfícies e manipuladores). O microrganismo, as características dos alimentos e as condições ambientais regulam a multiplicação e/ou a produção de toxinas.

Os fatores extrínsecos são conhecidos como as condições ambientais capazes de permitir a conservação ou a alteração dos alimentos. Então, a temperatura de conservação, a presença e concentração de gases e a humidade relativa são constituintes do ambiente externo do alimento. O controlo destas características ambientais pode inibir ou anular os microrganismos, sendo este o objetivo ao controlar os fatores extrínsecos. Os fatores intrínsecos são conhecidos como as características dos próprios alimentos, também capazes de afetar a multiplicação dos microrganismos. Estes fatores são: o pH, a a_w , o potencial de oxidação-redução, os constituintes antimicrobianos e as estruturas biológicas (Tondo, 2020).

O controlo e a manipulação adequada destes fatores vão permitir obter um alimento com uma maior longevidade no tempo de vida de prateleira. No entanto, com o passar do tempo, os alimentos acabam por ser sujeitos a alterações decorrentes da atividade microbiana, o que impõe uma limitação na duração da sua vida útil (data limite de consumo).

As alterações químicas mais relevantes são o escurecimento não enzimático, as reações enzimáticas e a oxidação, mais especificamente a oxidação lipídica. Quanto às alterações físicas, estas podem ser evitadas através de uma correta manipulação dos alimentos, no uso de embalagens e no controlo adequado das temperaturas de armazenamento (Singh and Cadwallader, 2004). Souza et al. (2019), reforçam a necessidade de implementar formações periódicas aos manipuladores sobre as práticas de higiene e segurança dos alimentos, com o propósito que os alimentos sejam manipulados e preparados de forma adequada, garantindo, assim a sua qualidade.

Os estudos destas alterações são conseguidos através de análises físico-químicas laboratoriais. Alguns exemplos de análises utilizadas são: a medição de pH, de a_w , da cor, da textura e a determinação do azoto básico volátil. Neste sentido, é possível determinar a validade dos produtos alimentares através destas mesmas análises (NZFSA, 2005).

3.1.1. Temperatura

O fator ambiental que mais impacto causa no crescimento dos microrganismos é a temperatura. O desenvolvimento dos microrganismos em diferentes temperaturas determina a sua capacidade de tolerar essa temperatura. Sendo assim, é possível conhecer uma temperatura mínima, uma temperatura ótima e uma temperatura máxima de desenvolvimento. A temperatura mínima é definida como aquela abaixo da qual o crescimento não é mensurável; a temperatura ótima é obtida quando a taxa de crescimento é máxima e a temperatura máxima define-se como aquela acima da qual o crescimento não é mensurável.

No espectro da temperatura ótima, é possível dividir os microrganismos em quatro grupos, os psicrófilos, os mesófilos, os termófilos e os hipertermófilos. As respectivas temperaturas encontram-se descritas na Tabela 1 (Ferreira et al. 2010).

Tabela 1 – Classificação dos microrganismos em função da temperatura ótima de desenvolvimento (Fonte: Ferreira et al. 2010).

Microrganismos	Temperatura mínima	Temperatura ótima	Temperatura máxima
Psicrófilos	0 °C	15 °C	20 °C
Mesófilos	15-20 °C	20-45 °C	45 °C
Termófilos	45 °C	55-65 °C	80 °C
Hipertermófilos	55 °C	80-113 °C	---

3.1.2. Disponibilidade de oxigénio

A necessidade de oxigénio (O₂) dos microrganismos varia consoante o metabolismo dos mesmos. Desta forma, é possível dividir os microrganismos em vários grupos tendo como base a sua relação com o O₂. Na tabela 2 verifica-se a relação dos microrganismos com o oxigénio e o seu metabolismo (Ferreira et al. 2010).

Tabela 2 – Relação dos microrganismos com o oxigénio e o seu metabolismo (Fonte: Ferreira et al. 2010).

Grupos	Relação com o O₂	Tipo de metabolismo
Aeróbios		
Estritos	Crescimento requer O ₂	Respiração aeróbia
Facultativos	Crescimento não requer O ₂ , mas é favorecido na sua presença	Respiração aeróbia, respiração anaeróbia, fermentação
Microaerófilos	Crescimento requer O ₂ , mas a níveis inferiores ao presente na atmosfera	Respiração aeróbia
Anaeróbios		
Estritos	A presença de O ₂ é tóxica ou letal	Fermentação ou respiração anaeróbia

3.1.3. Potencial hidrogeniónico

A acidez ou a alcalinidade dos alimentos é mensurável através do parâmetro potencial hidrogeniónico (pH), o qual é descrito como o inverso do logaritmo da concentração de protões

livres (H+) numa solução. O pH é um fator importante na indústria alimentar devido à facilidade com que pode ser modificado e à sua capacidade de inibir a multiplicação microbiana. O crescimento de microrganismos ocorre em intervalos de pH ótimos, exceto quando se modifica o pH, diminuindo ou inibindo, assim, o crescimento (Kalia and Rajinder, 2006).

De uma forma geral, os alimentos são incluídos em quatro categorias consoante o seu nível de acidez (Fellows, 2006). Os frutos encontram-se no grupo mais ácido dos produtos agrícolas, apresentando um característico pH inferior a 4,0 (Hui et al. 2006).

A tabela 3 apresenta as quatro categorias de alimentos em função da acidez, referindo alguns exemplos.

Tabela 3 – Classificação de alguns alimentos conforme o pH e microrganismos passíveis de multiplicação (Fonte: Fellows, 2006).

pH do alimento	Classificação de acordo com o pH	Alimento	Microrganismos capazes de se multiplicar
5,4 – 7,9	Alimentos de baixa acidez	Ovos, leite e alguns queijos, carnes refrigeradas, produtos cárneos embutidos, reestruturados, emulsionados, alimentos de origem marinha, certos vegetais, como milho, palmito, cenoura e batata, cereais, pães, etc.	Bactérias patogénicas, bactérias deteriorantes, fungos filamentosos e leveduras.
5,3 – 4,4	Alimentos de média acidez	Misturas de carnes e vegetais, vegetais fermentados, certas frutas (banana, abacate) e vegetais (vagem, cebola), sopas desidratadas, molhos, queijo cottage, etc.	
3,8 e 4,5	Ácidos	Tomate, pera, figo, abacaxi e outras frutas cítricas, maionese, etc.	Bactérias patogénicas (geralmente até pH 4,0), bactérias deteriorantes (inclusive lácticas e acéticas), fungos filamentosos e leveduras.
< 3,7	Muito ácidos	Picles, sumos cítricos, refrigerantes, bebidas fermentadas, maçã, etc.	Bactérias deteriorantes (inclusive lácticas e acéticas), fungos filamentosos e leveduras.

Especificamente, a tabela 4 exibe alguns valores aproximados de pH de certas frutas (adaptado de Jay, 1992).

Tabela 4 – Valores aproximados de pH de algumas frutas (Fonte: Adaptado de Jay,1992).

Frutas	Valor de pH	Frutas	Valor de pH
Maças	2.9–3.3	Laranjas	3.6–4.3
Bananas	4.5–4.7	Limas	1.8–2.0
Uvas	3.4–4.5	Melões	6.3–6.7
Melancias	5.2–5.6	Figos	4.6
Ameixas	2.8–4.6		

3.1.4. Atividade da água

No fim dos anos 50, a atividade da água (a_w) foi descrita como um indicador útil da estabilidade microbiológica dos alimentos e sistemas relacionados a alimentos, e não como uma simples medição do teor de água (Scott, 1957). Não só é um indicador de estabilidade microbiológica como também tem um papel importante nas propriedades sensoriais dos alimentos, destacando-se o sabor, o aroma e a textura. Influencia os mecanismos químicos e bioquímicas dos alimentos, como por exemplo, a oxidação lipídica e a atividade não/enzimática (Labuza and Rahman, 2007). A a_w foi então definida como a água que se encontra disponível para as reações químicas e para o crescimento microbiano nos alimentos. Este parâmetro torna-se essencial para a indústria alimentar, ficando conhecido como um indicador de estabilidade microbiológica dos alimentos (Alonzo, 2008; Maneffa et al. 2017). O crescimento bacteriano ocorre devido à presença de água, uma vez que esta facilita o transporte de moléculas entre o meio envolvente e a membrana citoplasmática da bactéria devido a gradientes de pressão osmótica (Coles and Kirwan, 2011).

A a_w estabelece valores que podem variar entre 0 e 1. Num determinado alimento, a inibição do desenvolvimento de microrganismos, é tanto maior quanto menor for o valor da a_w . Conseqüentemente, a disponibilidade de água encontra-se limitada e os mecanismos de regulação osmótica das células perturbados; os limites inibitórios da grande maioria dos microrganismos são conhecidos (Christian, 1980; Krist et al. 2000; Leistner and Gould, 2002). Portanto, a multiplicação bacteriana nos alimentos é menor com valores de a_w baixos e é maior com valores de a_w altos. Quando se observa valores de a_w inferiores ao mínimo, não significa que haja morte total das bactérias. As bactérias que sobreviverem poderão permanecer inativas, porém, mantêm a sua infecciosidade.

A a_w é um fator importante para a indústria alimentar, devendo ser considerado tão importante como outros, nomeadamente o pH e a temperatura (Forsythe, 2013).

3.2. Teoria dos obstáculos de Leistner: combinação entre fatores intrínsecos e os extrínsecos.

É possível conservar alimentos recorrendo a processos de inibição da multiplicação microbiana ao invés da inativação microbiana por tratamento térmico. Para tal, os processos como a diminuição de temperatura (refrigeração, congelação), redução da a_w (produtos desidratados) e acidificação dos alimentos são possíveis de empregar. Estes processos podem ser combinados em forma de obstáculos ou barreiras de modo a impedir o desenvolvimento de microrganismos que causam deterioração dos alimentos ou provocam toxinfecções alimentares. Então, o conceito de barreiras combina fatores físicos e químicos com o objetivo de promover a conservação dos alimentos (Forsythe, 2013).

Leistner and Gould (2002) estudaram as interações entre os fatores físicos e químicos que afetam a capacidade de sobrevivência e multiplicação dos microrganismos nos alimentos. Deste estudo surgiu a origem da Teoria dos Obstáculos de Leistner (Hurdle Theory). Também conhecida como barreira tecnológica, esta teoria dos obstáculos apresenta vantagens na sua utilização ao economizar energia, reduzir a quantidade de aditivos químicos e levar a menores perdas de alimentos (Leistner and Gorris 1995; Leistner e Gould 2002).

Segundo Leistner and Gorris (1995), para os alimentos se manterem seguros, estáveis e com a população natural de microrganismos sob controlo, é necessário que atravessem determinado tipo de obstáculo (seja físico, físico-químico, microbiológico e variados) com qualidade e intensidade diferentes. Na tabela 5, verificam-se alguns exemplos de obstáculos usados nas linhas de produção.

Tabela 5 - Classificação de alguns obstáculos e seus exemplos (Fonte: Leistner and Gorris, 1995).

Tipo de obstáculos	Exemplos
Obstáculos físicos	Alta temperatura (esterilização e pasteurização), baixa temperatura (refrigeração e congelamento), radiação ionizante e altas pressões
Obstáculos físico-químicos	Baixa a_w , baixo pH, baixo potencial redox, sais, nitritos e nitratos
Obstáculos microbiológicos	Microbiota competitiva e antibióticos
Obstáculos variados	Ácidos gordos livres e cloro

Na Figura 1, encontram-se, em destaque, três modelos de aplicação da Teoria dos obstáculos. Para o exemplo “(a)”, é possível verificar seis barreiras com a mesma intensidade, que os microrganismos irão atravessar: a barreira F é a de alta temperatura durante o processamento, a barreira t é de baixa temperatura durante o tempo de vida de prateleira (armazenamento), depois a barreira de a_w , a barreira de acidez (pH), a Eh para baixo potencial redox e a última barreira de conservantes (pres.). Tendo em conta o exemplo (a), o produto torna-se estável e seguro, uma vez que os microrganismos não conseguem ultrapassar todos os obstáculos apresentados durante o processo. O exemplo (b) é uma simulação mais realista de produção de alimentos devido ao facto de as barreiras possuírem diferentes intensidades e, principalmente, o controlo dos fatores de crescimento de microrganismos, a a_w e os conservantes (pres.). Por último, o modelo (c), que representa inicialmente um alimento com alto teor de nutrientes (N) e vitaminas (V), e desta forma favorecendo o desenvolvimento dos microrganismos, obriga a um uso mais intenso das outras barreiras com o objetivo de tornar o alimento estável e seguro.

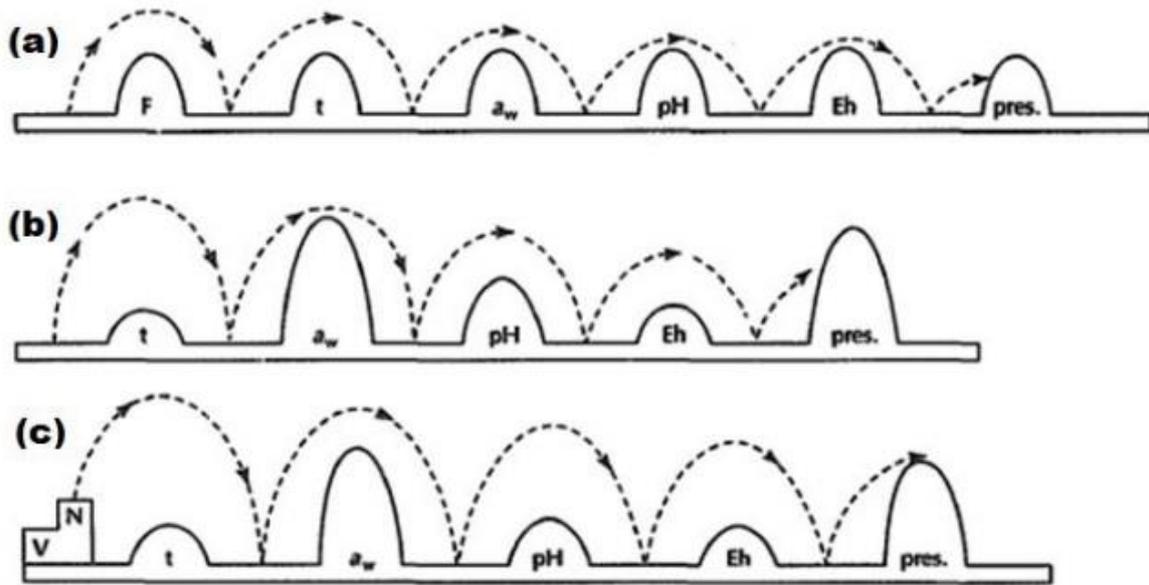


Figura 1 - Exemplos da aplicação da Teoria dos Obstáculos. Três modelos de aplicação da Teoria de obstáculos. Modelo (a) com barreiras de intensidade igual. Modelo (b) com barreiras de intensidade diferentes. Modelo (c) com alimento inicial de alto teor em vitaminas e nutrientes e barreiras com intensidade diferentes.

As barreiras com mais relevância na conservação dos alimentos são a temperatura (alta ou baixa), a a_w , o pH, o potencial redox (Eh), os conservantes e a microbiota competitiva. Contudo, estão disponíveis para uso mais de sessenta barreiras que melhoram a estabilidade e/ou a qualidade dos produtos e, por conseguinte, a sua conservação (Leistner and Gould 2002).

Em forma de conclusão, os fatores intrínsecos e extrínsecos podem ser considerados separadamente no estabelecimento do processamento dos alimentos, porém, a sua utilização em conjunto traz benefícios na confeção de produtos e no seu consumo. Esta combinação de fatores originou a teoria dos obstáculos que procura combater eficazmente os microrganismos e aumentar a data limite de consumo. O ponto-chave desta teoria passa por impedir o desenvolvimento dos microrganismos quando estes conseguem ultrapassar uma barreira, com a aplicação de outra barreira. Quantas mais barreiras, mais eficaz será o processo. É preciso mencionar que, por outro lado, quanto mais barreiras se colocar maior será o desafio em manter o produto sem alterações indesejáveis. Esta questão é um desafio para a indústria, uma vez que não é possível conseguir tirar o melhor dos “dois mundos”. No entanto, com o acompanhamento apertado e controlo das barreiras, com o conhecimento do produto e com a constante formação dos técnicos, é possível obter produtos seguros.

3.3. Determinações microbiológicas

A detecção de microrganismos potencialmente patogênicos ou a avaliação da carga microbiana, são dois exames possíveis de efetuar. Têm como principal intuito diminuir o risco de toxinfecções alimentares e, por sua vez, defender a saúde do consumidor. Secundariamente, permitem descobrir falhas e minimizá-las de forma a aumentar o tempo de vida de prateleira dos alimentos, bem como, alterações que conduzam à deterioração e correspondente perda dos alimentos. Estes exames podem ser realizados através de métodos convencionais, que exigem a homogeneização da amostra e posterior inoculação em meios específicos de crescimento, ou então, por métodos rápidos, que têm o intuito de produzir resultados num curto espaço de tempo (Forsythe, 2000).

A determinação do período de vida útil de um produto é obtida com o produto armazenado em condições normais de utilização, medindo, em intervalos preestabelecidos, a carga microbiana até que sejam alcançados os valores estipulados como limite (Kilcast and Subramaniam, 2000). Estes limites estão, usualmente, fundamentados em critérios microbiológicos que são criados por autoridades alimentares reconhecidas com valores limite definidos ou estabelecidos em regulamentos de cumprimento obrigatório (Forsythe, 2000). Estes limites servem de orientação para as empresas produtoras, no que toca à qualidade dos alimentos, bem como à higiene ao nível da produção, ou seja, revelam a qualidade sanitária da empresa. No Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005 encontra-se a definição de critério microbiológico como um critério que define a aceitabilidade de um produto, de um lote de géneros alimentícios ou de um processo, baseado na ausência ou presença de microrganismos, ou no seu número, e/ou na quantidade das suas toxinas/metabolitos, por unidade(s) de massa, volume, área ou lote.

O Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN), do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, tem o intuito de promover a saúde, prevenir doenças de origem alimentar e, acompanhar e cooperar com as demais instituições de forma a assegurar a saúde dos consumidores. Neste âmbito, o DAN elaborou um documento com os valores-guia para a interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de produção e distribuição alimentar, abreviadamente designado por “Valores-guia INSA” (INSA, 2019). Os "Valores-guia INSA" apresentam 4 Grupos de alimentos prontos para consumo:

- Grupo 1 – Alimentos que sofreram tratamento térmico;

- Grupo 2 – Alimentos compostos de alimentos totalmente cozinhados/pasteurizados, adicionados de componentes crus, ou carne ou peixe crus, prontos para consumo;
- Grupo 3 – Frutos e produtos hortícolas crus;
- Grupo 4 – Alimentos ou seus componentes contendo flora específica própria.

Na tabela 6 está indicado o Grupo e o Subgrupo de alimentos prontos para consumo tendo em consideração o tema da dissertação em estudo.

Tabela 6 - Grupo 3 – Frutos e produtos hortícolas crus (Fonte: INSA, 2019).

Subgrupo	Categoria de alimentos	Exemplos
3A	Frutos e produtos hortícolas crus cortados, ou preparados para consumo no próprio dia, com ou sem molhos, podendo incluir um pequeno apontamento de alimentos totalmente cozinhados	Fruta ao natural descascada, morangos e outros frutos vermelhos, saladas de frutas, saladas de produtos hortícolas crus (ex. alface, agrião, cebola, cenoura, rúcula, tomate), com ou sem molhos (ex. maionese, vinagrete) e com ou sem beterraba/milho cozidos.
	Sumos de frutos e/ou de produtos hortícolas frescos, para consumo no próprio dia	Bebidas e Sumos de ananás/beterraba/cenoura/espinafres/frutos vermelhos/laranja/limão/tomate.
3B	Frutos e produtos hortícolas crus minimamente processados (IV gama), incluindo Baby Leaf e rebentos	Fruta ao natural descascada, morangos e outros frutos vermelhos, saladas de frutas, saladas de produtos hortícolas crus (ex. alface, agrião, cebola, cenoura, rúcula, tomate), com ou sem molhos (ex. vinagrete, maionese).

Na preparação, produção e distribuição destes alimentos (dos Grupos 1 ao 4), considera-se a existência de zonas com características distintas de controlo de higiene, que estão interligadas e nas quais é necessário que sejam verificadas e avaliadas as BPH (tabela 7).

Tabela 7 - Zonas no ambiente de preparação/distribuição alimentar (Fonte: INSA, 2019).

Zonas	Superfícies
1	Superfícies em contacto direto com os alimentos durante os processos de preparação, confeção ou distribuição
2	Superfícies adjacentes à zona 1 - contactam com o material que contém, acondiciona ou contacta com alimentos (ex. vitrinas, painéis de proteção, suportes de equipamentos, câmaras de refrigeração/congelação ou células de arrefecimento rápido, panos, aventais/fardas)
3	Superfícies adjacentes à zona 2 - não contactam diretamente com os alimentos, nem com os materiais que os acondicionam (ex. pavimentos e ralos de escoamento, tetos, paredes, portas, material de limpeza)
4	Superfícies adjacentes às zonas de preparação/distribuição (ex. instalações sanitárias e vestiários, áreas de receção de matérias-primas e áreas de armazenamento)

Desde as fases iniciais de preparação dos alimentos até ao término nas fases de distribuição, os alimentos derivam destas Zonas, de forma contínua ou não, pelo que poderá ocorrer a transferência de microrganismos (contaminações cruzadas) caso não sejam cumpridas as BPH.

Assim sendo, no ambiente de preparação e distribuição alimentar as superfícies sobre as quais pode ser efetuada a amostragem são muito diversas, incluindo ou não, superfícies de qualquer uma destas 4 Zonas.

Os principais fatores a ter em conta num plano de controlo são a seleção e a localização das superfícies a amostrar, bem como, o método de colheita das amostras.

Estas Zonas foram introduzidas no revisto e atualizado “Valores-guia INSA”. Uma vez que esta matéria sai do âmbito da dissertação, mais informações sobre as superfícies e assuntos relacionados estão presentes nos “Valores-guia INSA”. A preocupação de partilhar esta informação serve de apelo e incentivo às novas empresas a adotar medidas mais rigorosas e abrangentes.

Na tabela 8 encontra-se, de forma categorizada, a interpretação da qualidade microbiológica. Isto é, um indicador de desempenho do processo e/ou um sistema de controlo da segurança alimentar.

Tabela 8 - “Valores-guia INSA” - interpretação da qualidade microbiológica (Fonte: INSA, 2019).

Nível da qualidade microbiológica	
Alimentos prontos para consumo	Satisfatório Todos os resultados de todos os parâmetros são satisfatórios
	Questionável Um ou mais do que um parâmetro com resultado questionável
	Não satisfatório Um ou mais do que um parâmetro com resultado não satisfatório
	Não satisfatório / potencialmente perigoso Um ou mais do que um parâmetro com resultado não satisfatório/potencialmente perigoso

A interpretação do nível da qualidade microbiológica, depende do número de unidades formadoras de colónias (ufc) por grama ou mililitro na amostra analisada e/ou da deteção ou não deteção de microrganismos patogénicos e/ou toxina(s) e classifica as amostras em 3 níveis:

- Satisfatório – o resultado analítico encontra-se dentro dos valores previstos, ou seja, inferior ou igual ao Valor Máximo de Referência (VMR);
- Questionável – o resultado analítico é superior ao VMR e inferior ou igual ao Valor Máximo Admissível (VMA) e indica que há probabilidade de existirem falhas nos processos. Recomenda-se que seja efetuada uma análise de causas, de forma a esclarecer a causa provável;
- Não satisfatório e Não satisfatório/potencialmente perigoso – o resultado analítico é superior ao VMA e indica que há falhas nos processos. Deve ser efetuada uma análise de causas, de forma a esclarecer a causa provável.

Em seguida, na tabela 9 estão listados os limites estabelecidos nos “Valores-guia INSA” para alguns microrganismos patogénicos e toxinas, enquanto na tabela 10 estão listados os limites estabelecidos nos “Valores-guia INSA” para microrganismos indicadores de higiene e de alteração nos Grupos e Subgrupos de alimentos prontos para consumo definidos, colhidos na área de preparação/distribuição alimentar

Tabela 9 - “Valores-guia INSA” - microrganismos patogênicos e toxinas em alimentos prontos para consumo (Fonte: INSA, 2019).

Microrganismos patogênicos e toxinas	Resultado			
	Contagem (ufc/g ou ufc/ml) ou Pesquisa (em 25 g) ^{Nota 1}			
	Satisfatório	Não satisfatório	Não satisfatório/potencialmente perigoso	Testes de referência
<i>Bacillus cereus</i> ^{Nota 2}	< 10 ³	10 ³ – ≤10 ⁵	>10 ⁵	Confirmar a capacidade de produzir toxina, tipificação molecular
Outros <i>Bacillus</i> spp. patogênicos	<10 ⁴	10 ⁴ – ≤10 ⁶	>10 ⁶	Tipificação molecular
<i>Clostridium perfringens</i>	<10 ²	10 ² – ≤10 ⁴	>10 ⁴	Tipificação molecular, detecção do gene codificador da toxina na estirpe isolada
Estafilococos coagulase positiva	<10	10 ² – ≤10 ⁴	>10 ⁴	Tipificação molecular, detecção da patogenicidade (detecção do gene codificador da toxina na estirpe isolada ou verificar se a estirpe é produtora de toxina), resistência aos antimicrobianos
<i>Listeria monocytogenes</i>	Não detetado	Detetado	>10 ²	Tipificação molecular e serotipagem das estirpes isoladas
<i>Campylobacter</i> spp	Não detetado	NA	Detetado	Tipificação molecular, resistência aos antimicrobianos
<i>Cronobacter</i> spp	Não detetado	NA	Detetado	
Enterotoxina estafilocócica	Não detetado	NA	Detetado	Identificação do grupo da toxina
<i>Escherichia coli</i> verotoxigênico (VTEC)	Não detetado	NA	Detetado	Tipificação molecular, resistência aos antimicrobianos

<i>Escherichia coli</i> patogénicos (EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, DAEC)	Não detetado	NA	Detetado	Tipificação molecular, resistência aos antimicrobianos
Norovírus	Não detetado	NA	Detetado	
<i>Salmonella</i> spp	Não detetado	NA	Detetado	Serotipagem, tipificação molecular, resistência aos antimicrobianos
<i>Shigella</i> spp	Não detetado	NA	Detetado	Tipificação molecular
<i>Vibrio cholerae</i>	Não detetado	NA	Detetado	Serotipagem, tipificação molecular
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Não detetado	NA	Detetado	Tipificação molecular
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Não detetado	NA	Detetado	Serotipagem, tipificação molecular

NA – Não Aplicável

ufc/g – unidades formadoras de colónias por grama

ufc/ml – unidades formadoras de colónias por mililitro

Nota 1 – Usualmente, o ensaio é realizado em 25 g ou em 25 ml de alimento por teste analítico; uma porção diferente pode ser requerida para algumas situações (ex. amostra insuficiente, preconizado em normas, investigação de surtos de toxinfecção alimentar).

Nota 2 – FDL reconstituídas (Subgrupo 1D) – os limites a considerar são: Satisfatório <5x10¹; Não satisfatório 5x10¹-10³; Não satisfatório/potencialmente perigoso >10³.

Tabela 10 - “Valores-guia INSA” - microrganismos indicadores de higiene e de alteração em alimentos prontos para consumo (Fonte: INSA, 2019).

Microrganismos indicadores de higiene e de alteração	Grupo e Subgrupos	Resultado		
		Contagens (ufc/g ou ufc/ml)		
		Satisfatório	Questionável	Não satisfatório
Microrganismos a 30 °C /Contagem de aeróbios mesófilos	1A, 1D ^{Nota 1}	< 10 ³	10 ³ - ≤10 ⁴	>10 ⁴
	1B	< 10 ⁴	10 ⁴ - ≤10 ⁵	>10 ⁵
	2A	< 10 ⁵		
	1C		10 ⁵ - ≤10 ⁶	>10 ⁶
	2B	razão CAM/BAL ≤100 ^{Nota 2}		

		< 10 ⁶		
	2D	razão CAM/BAL ≤100 Nota 2	10 ⁶ - ≤10 ⁷	>10 ⁷
	2C	< 10 ⁶		
	3A, 3B	razão CAM/BAL ≤100 Nota 2	10 ⁶ - ≤10 ⁸	>10 ⁸
	4 Nota 1	< 10 ⁶	10 ⁶ - ≤10 ⁸	>10 ⁸
		razão CAM/BAL ≤100 Nota 2		razão CAM/BAL >100
	1A, 1B, 1D			
	2A	< 10 ³	10 ³ - ≤10 ⁴	>10 ⁴
	1C			
	2B, 2D	< 10 ⁴	10 ⁴ - ≤10 ⁵	>10 ⁵
	2C, 3	< 10 ⁵	10 ⁵ - ≤10 ⁶	>10 ⁶
	4 Nota 1	NA	NA	NA
	1, 2, 3	<5x10 ²	5x10 ² - ≤10 ³	>10 ³
	4 Nota 1	NA	NA	NA
	1A, 1B	< 10 ²	10 ² - ≤10 ³	>10 ³
	1D	Não detetado em 10 ml ou em 10 g Nota 3	Detetado em 10 ml ou em 10 g e ≤10 ²	>10 ²
	2A	< 10 ³	10 ³ - ≤10 ⁴	>10 ⁴
	1C			
	2B, 2C, 2D	< 10 ⁴	10 ⁴ - ≤10 ⁵	>10 ⁵
	3A			
	3B	< 10 ⁵	10 ⁵ - ≤10 ⁶	>10 ⁶
	1	<10	NA	>10
		(Não detetado)		
	2	<10	10 – ≤10 ²	>10 ²
	3	(Não detetado)		
	Todos os grupos	<10	10 – ≤10 ²	>10 ²

NA – Não Aplicável

ufc/g – unidades formadoras de colónias por grama

ufc/ml – unidades formadoras de colónias por mililitro

CAM – Microrganismos aeróbios mesófilos

BAL – Bactérias ácido-láticas

Nota 1 – Aplicável quando a flora específica interfere neste ensaio.

Nota 2 – Sempre que o resultado dos "Microrganismos a 30 °C" for superior ao VMR e inferior ou igual ao VMA, deverá ser tida em conta a razão CAM/BAL na interpretação do resultado em amostras que contenham componentes pasteurizados e/ou incluam componentes com flora específica própria.

Nota 3 – Sempre que se detetem *Enterobacteriaceae* a amostra deve ser submetida a testes para deteção de *Cronobacter* spp..

4. Regulamentação

Tem vindo a ser observado um crescimento constante na procura de frutas minimamente processadas, individualizadas e/ou combinadas, talvez porque o consumidor reconhece e se sente atraído pelos benefícios provenientes das mesmas. Assim sendo, existe a necessidade de rever, implementar métodos e melhorar as BPH na indústria. Torna-se, assim, essencial garantir a diminuição do potencial de contaminação (CAC 2003b). O aumento da produção, distribuição e consumo global de produtos frescos em conjunto com métodos de produção mais intensivos e aplicação irregular de boas práticas agrícolas (BPA) explicam a alta incidência de doenças transmitidas por estes alimentos (Olaimat and Holley 2012).

Os padrões de segurança e qualidade nos produtos de fruta fresca comercializados são definidos, atualmente, em parte pelos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios descritos no Regulamento nº 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005 autorizado pela Comissão Europeia (CE).

4.1. Critérios microbiológicos constantes do Regulamento (CE) n.º 2073/2005

Na presente dissertação serão abordadas três bactérias presentes nos critérios microbiológicos de segurança alimentar do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de novembro. As bactérias que serão colocadas em análise são: a *E.coli*, a *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella*. Para além destas três bactérias, são mencionadas no Regulamento, a *Cronobacter sakazakii*, as Enterotoxinas estafilocócicas e a Histamina, que não serão estudadas.

4.1.1. *Escherichia coli*

Na família das *Enterobacteriaceae* destaca-se o género *Escherichia*, sendo a *Escherichia coli* (*E. coli*) a mais comum e importante (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996). O pediatra alemão Theodor Escherich

descreveu a mesma pela primeira vez em 1885. Theodor descobriu que esta bactéria estava naturalmente presente no trato gastrointestinal de crianças, atribuindo-lhe o nome de *Bacterium coli commune* (Escherich, 1988). Posteriormente, foi referida como habitante comensal do trato gastrointestinal de humanos e animais (Moriel et al. 2012). Existem várias estirpes de *E. coli*, algumas são inofensivas para o hospedeiro mas outras têm a capacidade de provocar doenças. A sua classificação tem como base a sintomatologia, os mecanismos de patogenicidade, os seus fatores de virulência e serologia (Kaper et al. 2004).

A *E. coli* é uma bactéria catalase-positiva e oxidase-positiva que pode crescer em temperaturas de 4°C a 45°C, com temperatura ótima de crescimento de 37° (ICMSF, 1996). É Gram-negativa, não forma esporos, fermenta a glicose e outros açúcares e tem forma de bacilo, podendo ser imóvel ou móvel por flagelos (Moxley 2013). É anaeróbia facultativa, no entanto, o seu desenvolvimento é mais favorável em condições aeróbias (Meng and Schroeder 2007). Para além da temperatura, o pH, a atividade de água (a_w) e a composição do alimento são fatores que limitam a multiplicação da *E. coli*. Em relação ao pH, é possível verificar crescimento entre 4,4 e 10 sendo que é ótimo entre 6 e 7. Quanto à a_w , o valor mínimo para ocorrer crescimento é de 0,95 verificando-se que no valor de 0,995 a *E. coli* cresce favoravelmente (ICMSF 1996; Desmarchelier and Fegan 2003).

A principal fonte de contaminação de *E. coli* provém do trato intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Contudo, determinadas estirpes de *E. coli* patogénicas para o Homem e para outros animais não fazem parte da flora intestinal normal. As principais vias de transmissão das infeções causadas por *E. coli* são o contacto direto com humanos, animais e/ou o consumo de alimentos contaminados. Os principais alimentos associados à contaminação por *E. coli* são as carnes mal cozinhadas, especialmente de origem bovina (hambúrgueres), enchidos curados, sumos de fruta não pasteurizados, sementes de alfafa, alface, queijo curado e leite cru (ESBUC 2016).

A *E. coli* é considerada um microrganismo indicador. Os microrganismos indicadores são grupos passíveis de serem identificados nos alimentos com o propósito de indicar uma possível contaminação fecal e/ou uma provável presença de bactérias patogénicas e/ou a deterioração do alimento. As *Enterobacteriaceae* constituem um grupo de microrganismos indicadores. Englobam bastantes géneros bacterianos, indicando condições sanitárias inadequadas durante o processo e armazenamento do alimento, ou a qualidade microbiológica das superfícies.

4.1.2. *Salmonella*

Um dos principais agentes bacterianos que provocam infecções transmitidas por alimentos em humanos em todo o mundo é a *Salmonella* spp. (Herikstad et al. 2002). A ingestão de serotipos patogênicos de *Salmonella* spp. provocam a salmonelose, uma conhecida intoxicação alimentar. Descobertas pelo Dr. Daniel Salmon, a *Salmonella* spp. tem estado presente nas intoxicações alimentares desde há 100 anos (Yan et al. 2003).

As bactérias deste género são Gram-negativas, anaeróbias facultativas (Leedom Larson and Spickler, 2013), têm 2 a 5 µm de comprimento e 0,8 a 1,5 µm de largura, não formam esporos e exibem forma de bacilos (Annous and Gurtler, 2012). O crescimento e sobrevivência deste género é determinado por vários fatores como a temperatura, o pH e a a_w . O intervalo de temperatura favorável ao desenvolvimento da *Salmonella* spp., varia entre os 5,2 a 46,2°C (ICMSF 1996), no entanto, verifica-se que a temperatura ideal para o crescimento é cerca de 38°C. Sendo não formadora de esporos, a *Salmonella* spp. torna-se relativamente termossensível e, por conseguinte, pode ser destruída a 60°C durante 15 a 20 minutos (Forsythe, 2005). Apesar de as baixas temperaturas ambientes, por exemplo, temperaturas de congelação, impedirem o crescimento e desenvolvimento da *Salmonella* spp, estas não garantem que o organismo seja totalmente destruído. Verifica-se que existe uma rápida diminuição do número inicial de organismos vivos a temperaturas próximas da congelação, no entanto, este género tem a capacidade de sobreviver a um longo período de armazenamento a baixas temperaturas (Jay et al. 2003). Verifica-se, também, o crescimento em ambientes com valores de pH entre 4,5 e 9,3, sendo que entre 6,5 e 7,5 é mais favorável ao crescimento. O valor mínimo de a_w onde se observa crescimento é de 0,93. O crescimento é inibido em meios onde a concentração de NaCl encontra-se entre os 3 e 4% (m/v) e em ambientes secos, são extremamente resistentes (ESBUCP, 2016).

Em suma, a *Salmonella* spp. tolera meios ácidos e baixas e altas temperaturas, tornando, assim, a sua desinfeção difícil (Yeni et al. 2016). Os tratamentos térmicos tornam-se menos eficazes quando são usados teores elevados de gordura e baixos valores de a_w , (ESBUCP, 2016).

Os animais vertebrados de sangue quente estão principalmente associados à *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, cuja transmissão ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminados por fezes (Uzzau et al. 2000; Bell and Kyriakides 2001; Crum-Cianflone 2008).

A febre entérica, a bacteriemia, a colite e as infecções focais são algumas das doenças provocadas pela bactéria. Particularmente a *Salmonella enterica* causa febre entérica e gastroenterite em humanos e animais (Didelot et al. 2011). As infecções em humanos decorrentes da ingestão da bactéria estão, geralmente, associadas ao contato com animais e com o consumo de produtos contaminados, tais como os ovos de aves, carne e produtos derivados do leite (William et al. 2003). O processamento de alimentos, seja em ambientes industriais ou domésticos, as superfícies, os equipamentos ou outros materiais utilizados, quando desinfetados inadequadamente, podem constituir uma fonte de contaminação da bactéria (Food and Drug Administration, 2012).

Sendo uma *Enterobacteriaceae*, a *Salmonella* spp. é um indicador de qualidade microbiológica geral dos alimentos.

4.1.3. *Listeria monocytogenes*

As espécies de *Listeria* estão amplamente disseminadas na natureza, contudo, a *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas agentes patogênicos, ou seja, são agentes que causam listeriose (Orsi et al. 2011; Lakicevic et al. 2015). Destes 2 agentes causadores de listeriose, a *Listeria monocytogenes* é o agente patogênico principal em humanos e animais (Brito, 2003).

A *L. monocytogenes* tem um diâmetro de cerca de 0,5 a 1-2 μm de comprimento (Bell and Kyriakides 2009; Weller et al. 2015), é Gram-positiva, anaeróbia facultativa, catalase-positiva e oxidase-negativa. Tem forma de bastonete, não forma esporos e possui mobilidade através de flagelos (a 25°C verifica-se uma mobilidade do tipo “cambalhota” e a 35°C é imóvel) (Bell and Kyriakides 2009). Desenvolve-se a temperaturas entre os 0 e os 45°C, rondando a temperatura ótima de crescimento entre os 30 e os 37°C. Quanto ao pH, verifica-se que ocorre crescimento entre pH de 4,3 a 9,4, sendo que o crescimento máximo se encontra entre o pH de 6 a 8 (George et al. 1988; Yousef and Lado, 2007). Nas condições de temperatura e pH ideais, o crescimento da *L. monocytogenes* inicia-se no limite de a_w de 0,92. Tem a capacidade de tolerar concentrações de NaCl até 10 % e é inibida em concentrações de CO₂ superiores a 80 % (ESBUC, 2016).

A listeriose, provocada pela *L. monocytogenes*, é transmitida por alimentos e apresenta uma alta taxa de mortalidade (Murray et al. 1926). Este agente patogênico tem a aptidão de sobreviver e multiplicar-se em condições extremas, nomeadamente, em temperaturas de refrigeração, em alta salinidade e em ambientes ácidos tornando-o numa

ameaça importante para a indústria alimentar (Likotrafiti et al. 2013). É possível encontrá-lo em diversos meios na natureza, tais como na água, nas plantas, no solo, na silagem, em animais e em esgotos. São considerados fontes de infecção os alimentos como vegetais, laticínios, carne vermelha, aves e frutos do mar (Harrigan 2008; Marshall and Levy 2011). Nos dias de hoje e no ritmo moderno acelerado que se vive, a população está a consumir cada vez mais produtos prontos a consumir (RTE – Ready-to-eat) e produtos alimentares prontos para cozinhar, que requerem um processamento mínimo (Davis and Stewart 2002). Este tipo de alimentos contribui para que exista um alto risco de contaminação a nível alimentar que pode provocar graves consequências à saúde.

Pessoas saudáveis que consomem alimentos contaminados com *L. monocytogenes* aparentam ser assintomáticas, no entanto, pessoas suscetíveis, ao consumirem 10 a 100 ufc/g, apresentam potencial para desenvolver uma intoxicação alimentar (Hof and Hefner 1988; Buchanan et al. 2017). Existem duas formas de apresentação clínica da listeriose, a invasiva e a não invasiva. A listeriose invasiva é definida pela capacidade de infecção de órgãos/regiões estéreis do corpo, ou seja, invade órgãos como o fígado (Wing and Gregory 2002), o líquido cefalorraquidiano (Cone et al. 2003), o baço (Aoshi et al. 2009) e o sangue (Bhat et al. 2013). Em adultos os sintomas apresentados são diarreia e febre, nas mulheres grávidas a diarreia, a febre, e o possível aborto ou natimorto (Pérez-Trallero et al. 2014) e no recém-nascido são a sépsis, a pneumonia e a meningite (Brouwer et al. 2006; Gaschignard et al. 2011; Khoury et al. 2012; Camacho-Gonzalez et al. 2013; Okike et al. 2013) A forma não invasiva está associada a gastroenterite febril ou a gastroenterite não invasiva a qual resulta da ingestão de alimentos contaminados, tais como o milho (Aureli et al. 2000), o queijo, o leite com chocolate (Proctor et al. 1995), o peixe defumado e carne (Gottlieb et al. 2006; Lin et al. 2006), entre outros.

A prevenção passa por implementar medidas fundamentais em toda a cadeia de produção de forma a evitar uma possível contaminação. Apresentar um plano de higienização onde se procure o cumprimento de boas práticas de higiene (BPH) e de fabrico (BPF) que seja capaz de eliminar a contaminação cruzada, de superfícies, de equipamentos e de matérias-primas. Implementar um sistema de autocontrolo, o HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points), que tem como fundamento a prevenção e eliminação de possíveis fontes de contaminação (ESBUC, 2016).

A tabela 11 mostra o resumo das características das 3 bactérias mencionadas.

Tabela 11 – Características das 3 bactérias em estudo.

Bactéria	Gram	Formação de Esporos	Temperatura Ideal (°C)	Período de Incubação	Produz Toxinas no Alimento?
<i>E. coli</i>	Negativa	Não	35 a 37	Poucas horas a 4 dias	Não
<i>Listeria monocytogenes</i>	Positiva	Não	30 a 37	Até 2 meses	Não
<i>Salmonella</i>	Negativa	Não	38	8 a 36 horas	Não

4.1.4. Outros perigos microbiológicos

O Regulamento (CE) n.º 2073/2005, enumera outros perigos, tais como as bactérias *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, vírus como o Norwalk, Hepatite A, Hepatite E e Rotavírus) e parasitas *Cyclospora cayetanensis* e *Cryptosporidium parvum* (Forsythe, 2005).

A bactéria *Campylobacter* spp. tem estado na origem de alguns surtos devido a falhas nos sistemas de desinfecção de águas contaminadas. A doença Shigelose, provocada pela bactéria *Shigella* spp., é despoletada, maioritariamente, pela ingestão de alimentos ou água contaminados com fezes. No caso dos alimentos, o principal fator de contaminação é, geralmente, a falta de higiene pessoal entre os manipuladores de alimentos. No caso da bactéria *Yersinia enterocolítica*, a contaminação pode advir da falta de saneamento e de técnicas de esterilização inadequadas pelos manipuladores de alimentos, incluindo o armazenamento inadequado. Tanto o *Clostridium perfringens* como o *Clostridium botulinum*, podem contaminar alimentos crus, como vegetais ou frutas. Uma das medidas de higienização destes perigos alimentares passa por lavar os produtos frescos em água corrente limpa. A bactéria *Bacillus cereus*, é inibida através da implementação de medidas de boa higiene, como lavar as mãos, alimentos, utensílios e ambiente de cozinha. Outra medida importante a realizar passa pela separação de alimentos crus dos cozinhados. O *Vibrio parahemolyticus* e o *Vibrio vulnificus* são controlados através da lavagem de alimentos crus, da lavagem das mãos, de equipamentos e de superfícies para cozinhar com água salubre. Após a lavagem das superfícies da cozinha, há que higienizar as mesmas com um desinfetante comercial. Os

vírus (vírus Norwalk, Hepatite A, Hepatite E e Rotavírus) estão associados a infeções transmitidas de pessoas para pessoas através de contacto pessoal ou por objetos. As medidas de prevenção para diminuir a propagação destes vírus são a lavagem frequente das mãos, a lavagem dos alimentos, cozinhar corretamente os alimentos e evitar o contacto com pessoas, alimentos ou objetos contaminados. Os parasitas também podem surgir nos alimentos, como por exemplo o *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum* e *Anisakis simplex*. Estes podem ser eliminados ou reduzir o risco de contaminação através de uma lavagem cuidadosa das frutas e vegetais e de uma boa higiene pessoal, respetivamente para o *Cyclospora cayetanensis* e *Cryptosporidium parvum* (Food and Drug Administration, 2012).

A menção destes exemplos pretende mostrar como é essencial tomar as devidas precauções em ambiente industrial e não só, como é essencial usá-las no nosso dia a dia.

5. Aditivos alimentares

A definição de aditivo alimentar segundo o Regulamento (CE) Nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008 é

“Aditivo alimentar é qualquer substância não consumida habitualmente como género alimentício em si mesma e habitualmente não utilizada como ingrediente característico dos géneros alimentícios, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional aos géneros alimentícios, com um objetivo tecnológico na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenagem, tenha por efeito, ou possa legitimamente considerar-se como tendo por efeito, que ela própria ou os seus derivados se tornem direta ou indiretamente um componente desses géneros alimentícios. O termo não inclui contaminantes ou substâncias adicionadas aos alimentos para manter ou melhorar as qualidades nutricionais.”

Os consumidores encontram-se cada vez mais atentos aos processos de segurança dos alimentos e ao uso de produtos auxiliares, sendo ainda hoje controverso o uso de aditivos alimentares. A sua utilização é um tópico que desperta a preocupação dos consumidores (Varela and Fiszman, 2013). O uso de aditivos alimentares encontra-se regido pelo Regulamento (UE) n.º 1129/2011 da Comissão de 11 de novembro de 2011, que designa o nome do aditivo alimentar e o seu número E, os géneros alimentícios a que o aditivo alimentar pode ser adicionado e as condições em que o aditivo alimentar pode ser usado, e as restrições à venda direta ao consumidor final.

Os aditivos mais comuns presentes nos rótulos dos alimentos são os antioxidantes, os corantes, os emulsionantes, os estabilizadores, agentes gelificantes e espessantes, os conservantes e os edulcorantes. Neste estudo, o aditivo alimentar abordado será o ácido ascórbico que pertence ao grupo dos antioxidantes. É muito utilizado neste tipo de alimento uma vez que previne as alterações de cor e alterações no sabor.

5.1 Antioxidantes

A definição de antioxidante, descrita por Halliwell and Gutteridge (2015), é de substâncias que se encontram em concentrações baixas, em relação às concentrações de substrato oxidante, e que previnem significativamente ou atrasam a oxidação de substratos suscetíveis.

As frutas e os vegetais, conhecidos como alimentos nutritivos, têm na sua constituição moléculas como os compostos fenólicos, os β -caroteno, os α -tocoferol e as vitaminas E e C. São poderosos antioxidantes naturais que devem fazer parte da dieta e ajudam a prevenir o aparecimento de várias doenças (Gaulejac et al. 1999).

5.1.1 Ácido Ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico, ou vitamina C, é um antioxidante presente em muitos seres vivos e alimentos. Os citrinos, a groselha preta, os tomates, os pimentos verde e vermelho, os vegetais folhosos e outros alimentos são fontes ricas em vitamina C.

O ácido ascórbico está envolvido em vários mecanismos, nomeadamente na ativação do sistema imunitário, na absorção de ferro e na síntese de colagénio; participa na cicatrização de feridas e na osteogénese e ajuda na manutenção de capilares, ossos e dentes (Fox and Cameron, 1989; Cathcart, 1991; Sies et al. 1992; Bhagavan, 2001; Padayatty et al. 2003; Erdurak-Kiliç et al. 2006). Por outro lado, deficiências graves em ácido ascórbico despoletam várias doenças, sendo uma delas o escorbuto. O escorbuto resulta da carência do ácido ascórbico como cofator da enzima prolil hidroxilase na etapa de hidroxilação. Desta forma, a formação de compostos de hidroxiprolina fica comprometida, originando a má formação de colagénio (Smirnoff and Pallanca, 1996).

As plantas e a maioria dos animais sintetizam o ácido ascórbico a partir da glucose. Nos animais como os peixes primitivos, répteis e anfíbios esta síntese ocorre no rim, enquanto nos mamíferos ocorre no fígado, onde a glucose é convertida pela enzima L-gulonolactona oxidase em ácido ascórbico (Stone, 1972; Du et al. 2012). Porém, devido a uma mutação

genética, os humanos, alguns primatas e os porquinhos-da-Índia têm uma deficiência na enzima L-gulonolactona oxidase, o que os torna incapazes de sintetizar o ácido ascórbico. Assim, é essencial a presença desta vitamina na dieta (Valpuesta and Botella, 2004).

O ácido ascórbico é estável no estado sólido, no entanto, em solução aquosa, rapidamente oxida a ácido L-dehidroascórbico. Isto ocorre devido à presença de um redutor forte na sua estrutura, o grupo redutona. Este grupo encontra-se em vários seres vivos e atua como antioxidante (Ribeiro and Seravalli, 2007). O ácido ascórbico é utilizado maioritariamente como antioxidante, no entanto, pode atuar como pró-oxidante (Buettner, 1986). Tem como papel principal conferir proteção às células das espécies reativas de oxigénio (ROS), cujos produtos do metabolismo celular normal têm efeitos nocivos nas células. Desempenha também um papel protetor importante em condições de stress, uma vez que os danos provocados às células aumentam a produção de ROS (Foyer and Noctor, 2011; Gest et al. 2013). Sendo um agente redutor, tem a capacidade de reduzir ou neutralizar uma ROS, como por exemplo, o peróxido de hidrogénio (Padayatty et al. 2003).

O ácido ascórbico, é um cofator para várias enzimas e apresenta-se sob a forma reduzida ou sob a forma oxidada, ou seja, como ácido L-ascórbico ou como ácido dehidroascórbico, respectivamente (Rizzolo and Polesello, 1992). É mantido nas células na sua forma reduzida através da reação com a glutatona e, por conseguinte, esta é catalisada pela proteína-dissulfeto isomerase e glutaredoxinas (Meister, 1994).

O ácido ascórbico é facilmente degradado por enzimas e pelo oxigénio atmosférico, tornando-se numa substância lábil. A sua oxidação é acelerada pelo calor excessivo, pelos metais leves e pesados (Bhagavan, 2001). Quanto mais ácido e compacto é o alimento e quanto mais frio e húmido é o ambiente, menores são as perdas de vitamina (Léger, 2008).

O ácido ascórbico é muito utilizado como antioxidante na indústria alimentar para prevenir mudanças indesejadas de cor e/ou sabor. Uma vez que é um doador de eletrões, atua como um dos mais importantes antioxidantes, de baixo peso molecular, que contribui para a capacidade antioxidante total - um importante indicador de qualidade de alimentos e bebidas (Pisoschi et al. 2009; Popa et al. 2010; Popa et al. 2012). O papel crucial do ácido ascórbico tanto em bioquímica como na utilização por parte da indústria alimentar, torna a sua determinação, um tema interessante ainda com território por explorar (Hsu et al. 2008).

6. Objetivos e Hipótese de Investigação

Os objetivos podem ser divididos em objetivo geral e objetivos específicos. De acordo com Fortin (2009), o objetivo geral é o fio orientador de toda a investigação, ou seja, é ele que apresenta a ideia central do trabalho a realizar. Deste modo, e tendo em conta a revisão da literatura realizada, o presente trabalho tem como objetivo avaliar e categorizar o risco presente nas frutas frescas prontas para consumo. Foi tido em conta o sistema *Hazards Analysis and Critical Control Points* (HACCP) definido pela Codex Alimentarius Commission, CAC/RCP 1-1969, Rev. 4 (2003), e o Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro, durante as etapas do estudo. Os objetivos específicos relacionam-se com os resultados que se pretende obter com uma pesquisa e um trabalho de investigação mais profundo e detalhado (Fortin, 2009). Assim, no presente trabalho os objetivos fundamentais são os seguintes:

- a) Posicionar a fruta em três categorias consoante o risco de contaminação bacteriana;
- b) Desenvolver um plano de medidas corretivas e recomendações para prevenir a contaminação bacteriana na preparação da fruta.

A formulação de hipóteses é um processo essencial na elaboração de um trabalho de investigação, uma vez que todos os resultados obtidos vão depender diretamente da forma como estas foram elaboradas. Segundo o Regulamento (CE) N.º 2073/2005 de 15 de Novembro relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, os produtos com um pH < 4,4 ou com $a_w < 0,92$, os produtos com um pH < 5,0 e com $a_w < 0,94$ e os produtos com um período de vida útil inferior a 5 dias são automaticamente considerados como pertencentes à categoria de alimentos prontos para consumo não suscetíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a latentes e a fins medicinais específicos. Assim, traçou-se a seguinte hipótese:

- As frutas minimamente processadas apresentam valores de pH que lhes permitem ser englobadas na categoria referida, ou devem ser avaliadas separadamente, e a medição de pH no decurso do processo, deve ser considerado um ponto crítico de controlo?

7. Material e Métodos

O estudo foi realizado numa empresa de produção e comercialização de frutas descascadas, prontas a consumir (FRUTA IV GAMA), de Sumos de Fruta, Purés de Fruta, Sobremesas e Sanduíches. A escolha do produto para estudo recaiu nas frutas prontas a consumir. Na figura 2 pode-se observar o fluxograma referente à preparação de fruta para consumo minimamente processada, onde se pode observar as principais etapas de todo o processo desde a receção da matéria-prima até ao envio para as superfícies comerciais para venda:

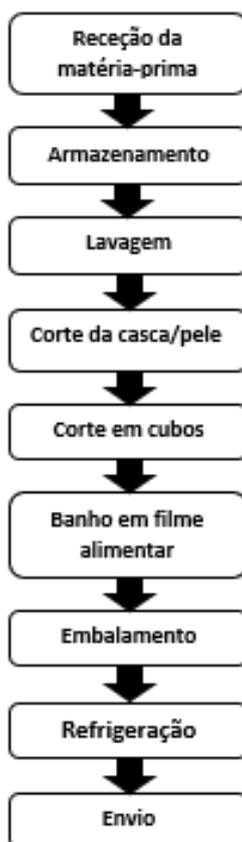


Figura 2 - Etapas da preparação de fruta para consumo, minimamente processada.

Foi designado o tipo de fruta a usar e, posteriormente, definiu-se o rumo a seguir. A fruta escolhida foi abacaxi e melão (em maior proporção) e meloa, manga e uvas (em menor proporção), e o estudo foi conduzido dentro do seu período de vida útil de 5 dias. A realização das amostras cumpriu o fluxograma mencionado, exceto no passo do banho em filme alimentar, onde metade das amostras foi mergulhada num filme alimentar com ácido

ascórbico, e a outra metade não. Após o banho, o produto é embalado em caixas de plástico e seladas a quente, sem alteração alguma da atmosfera.

Paralelamente, estudaram-se igualmente algumas amostras que estavam mantidas em refrigeração, as quais também tinham sido higienizadas com ácido ascórbico, e cujo período de vida útil estava já ultrapassado ou perto do fim da validade. É importante mencionar que, para além do ácido ascórbico, estas amostras foram expostas a outro aditivo alimentar, o cloreto de cálcio (E509), e que, poderá influenciar os valores do pH em estudo.

7.1 Processo de produção

7.1.1. Amostras

Procedeu-se à obtenção de 18 amostras de fruta fresca pronta a consumir: seis amostras de 50g cada, compostas por Abacaxi; seis amostras de 50g cada, compostas por Melão e seis amostras de 50g cada, compostas por uma mistura de frutas - Abacaxi, Mela, Manga e Uvas.

Todo o processo foi feito em separado. As frutas foram retiradas da câmara frigorífica e lavadas com a casca/pele. De seguida, removeu-se a casca e procedeu-se ao corte da fruta em cubos. De um total de 900gr de fruta, separaram-se cento e cinquenta gramas de Abacaxi, cento e cinquenta gramas de Melão e cento e cinquenta gramas de Abacaxi, Mela, Manga e Uvas, as quais foram lavadas num filme alimentar com ácido ascórbico. As restantes amostras (450gr), permaneceram separadas e sem filme alimentar.

No final, obtiveram-se 6 recipientes para cada fruta e mistura de frutas - 3 recipientes de cada fruta e mistura de frutas tratados em filme alimentar e os restantes 3 de cada, não foram tratados em filme alimentar.

Para uma correta leitura do pH e da temperatura, o conteúdo de cada um dos recipientes foi isoladamente triturado e homogeneizado. Posteriormente, efetuou-se a leitura e registo do pH e temperatura.

As 18 amostras foram produzidas e avaliadas no mesmo dia de produção. Já as amostras com prazo de validade expirado tinham sido produzidas anteriormente e mantidas em refrigeração. As frutas utilizadas nas preparações produzidas antecipadamente foram higienizadas em filme alimentar, antes do corte (frutas inteiras, ainda com casca) e depois do corte.

7.1.2 Amostras simples de fruta fresca e de mistura de frutas prontas a consumir, utilizando filme alimentar

A fruta utilizada nas amostras simples foi o Abacaxi e o Melão. As frutas das 6 amostras foram mergulhadas, separadamente, num filme alimentar de ácido ascórbico e encontram-se representadas na fotografia da figura 3:

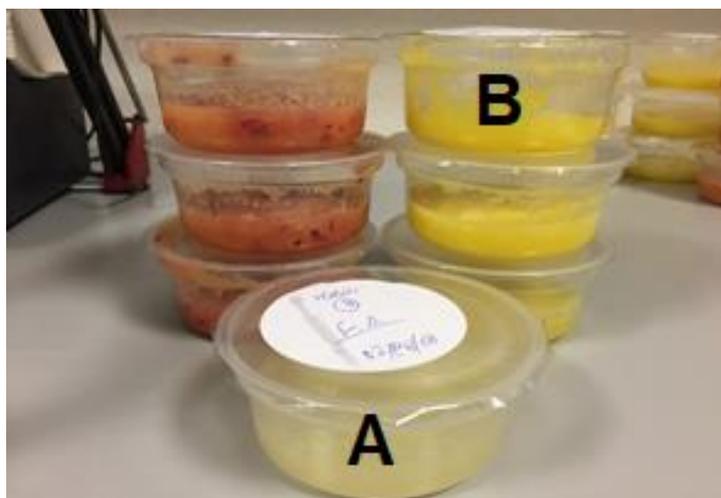


Figura 3 - Amostra de Melão, em baixo e ao centro (A) e amostra de Abacaxi, por trás, à direita (B), obtidas de fruta mergulhada num filme alimentar de ácido ascórbico, triturada e homogeneizada.

A fruta utilizada nas amostras de mistura foi o Abacaxi, a Meloa, a Manga e as Uvas. Também neste caso, as frutas das 3 amostras foram mergulhadas num filme alimentar de ácido ascórbico e encontram-se representadas na figura 4:



Figura 4 - Amostra de mistura de frutas (C), obtidas de frutas mergulhadas num filme alimentar de ácido ascórbico, trituradas e homogeneizadas.

7.1.3 Amostras simples de fruta fresca e de mistura de frutas prontas a consumir, sem utilizar filme alimentar

Na obtenção das amostras representadas na figura 5 seguiu-se o mesmo processo, mas as frutas usadas não passaram pelo filme alimentar em ácido ascórbico.



Figura 5 - Amostras de Melão à esquerda (D), amostras de Abacaxi por trás (E) e amostras de mistura de frutas à direita (F), trituradas e homogeneizadas, sem uso de filme alimentar.

7.1.4 Amostras simples de fruta fresca e mistura de frutas prontas a consumir, banhadas em filme alimentar, com período de vida útil ultrapassado

Em dias anteriores àqueles em que decorreu o presente estudo, tinham sido obtidas amostras de frutas simples e de misturas de frutas, nas mesmas condições, ou seja, com passagem das frutas por filme alimentar com ácido ascórbico, as quais foram mantidas em refrigeração (entre 4°C e 6°C), até atingirem ou ultrapassarem o prazo de validade. Estas amostras estão identificadas nas figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11.



Figura 6 - Amostra de Melão (N) produzida a 31/07/2018 e aberta para avaliação no dia 07/08/18, portanto, encontra-se com dois dias em período de vida útil ultrapassado; amostra de Abacaxi (A1) produzida a 31/07/2018 e aberta no dia 07/08/18, também com dois dias em período de vida útil ultrapassado; amostra de Abacaxi (A2) produzida a 02/08/2018 e aberta no último dia do período de vida útil, 07/08/18.



Figura 7 - Amostra de mistura de frutas (M1) – constituída por Abacaxi, Melão, Melão e Uva, produzida a 31/07/2018 e aberta no dia 07/08/18, portanto, dois dias com período de vida útil ultrapassado. Amostra de mistura de frutas (M2) – constituída por Abacaxi, Melão, Manga e Uva, produzida a 02/08/2018 e aberta no último dia do período de vida útil, 07/08/18. Amostra de mistura de frutas (M3) – constituída por Abacaxi, Melão, Manga e Uva, produzida a 02/08/2018 e aberta no último dia do período de vida útil, 07/08/18.

Estas amostras foram retiradas da refrigeração, trituradas e transportadas até ao local de análise. Neste período em que estavam fora da refrigeração, à temperatura ambiente, tentou-se simular um cenário real do ponto de vista do consumidor. Assim, depois de abertas, as amostras foram mantidas, sem qualquer controlo, à temperatura ambiente até terminar a medição do pH e da temperatura.

7.2. Equipamento de pH e temperatura

Para as medições de pH e da temperatura utilizou-se um medidor de bancada da marca *HANNA instruments*, modelo pH 2110 representado nas figuras 12 e 13. Entre cada medição, a limpeza da sonda era efetuada com água desmineralizada (mantida à temperatura ambiente) e limpa com papel.

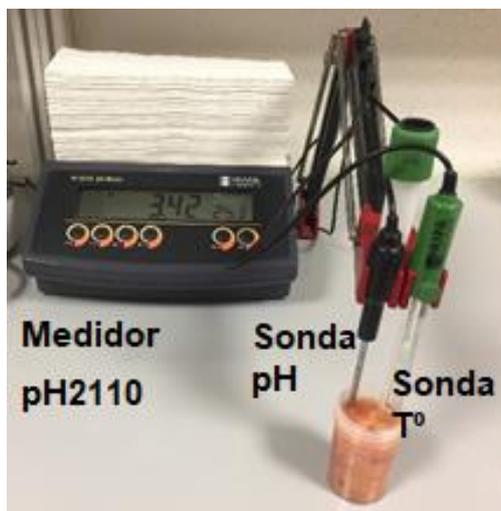


Figura 8 – Medidor de bancada *HANNA instruments*, modelo pH2110 com os dois sensores, um de pH e um de temperatura.



Figura 9 - Mostrador do medidor de bancada da marca *HANNA instruments* do modelo pH2110 com valores exemplo de pH e de temperatura.

O equipamento é calibrado semanalmente e de acordo com as recomendações do fabricante, usando duas soluções padrão, uma solução com pH 4 e outra de pH 7. Desta forma, o equipamento mantém os seus padrões de pH precisos.

8. Apresentação dos Resultados

Os resultados do pH e da temperatura a seguir apresentados, exceto os valores de a_w , das amostras em estudo, como também das amostras em período de vida útil ultrapassado, foram obtidos noutra local de análise. As amostras até chegarem a esse local, foram removidas da arca de refrigeração, abertas da sua embalagem, trituradas para facilitar a sua análise e transportadas, em temperatura ambiente, até ao local de análise.

8.1. Estudo das propriedades organoléticas

O início do estudo decorreu com a análise das propriedades organoléticas das amostras. Visualmente, todas as amostras se mantiveram inalteradas, ou seja, a cor não sofreu alterações, mesmo nas amostras produzidas antecipadamente. De igual modo, todas as amostras mantiveram o seu cheiro característico, fresco e aromático. Ao nível da textura, antes da trituração, todas as frutas apresentavam a sua consistência natural. Quanto ao sabor, também não foram registadas alterações nas amostras produzidas no momento; por precaução, a fruta produzida antecipadamente não foi objeto de estudo. Foi concluído que, independentemente do uso do filme alimentar, as frutas não sofreram alterações indesejáveis e que possam impedir o seu consumo pelo consumidor.

8.2. pH das amostras

O gráfico 3 mostra os registos do pH das amostras com e sem filme alimentar. Como é possível verificar, o pH das amostras de abacaxi, de melão e mistura de frutas com filme alimentar, oscila entre 3,16 e 3,20, entre 6,10 e 6,19 e entre 3,42 e 3,43, respetivamente. Entre amostras do mesmo fruto, o pH teve uma ligeira oscilação nas casas decimais. No entanto, observa-se uma diferença entre as amostras das várias frutas em estudo. A mistura de frutas tem um valor de pH ligeiramente superior ao valor do abacaxi, ainda que se ambos se encontrem no intervalo de 3 a 4. Já o pH do melão registado é de 3 valores acima, encontrando-se perto do pH neutro.

Os registos do pH das amostras sem filme alimentar para o abacaxi, melão e mistura de frutas, variaram de 3,13 a 3,16, de 6,28 a 6,30 e de 3,44 a 3,46, respetivamente. Tal como nas amostras anteriores, verifica-se que, entre amostras do mesmo fruto, o pH quase não oscila. Contudo, observa-se a mesma diferença entre frutas. De novo, a mistura de frutas revelou valores de pH ligeiramente superiores aos do abacaxi, mantendo-se no intervalo de 3

a 4. Em relação ao melão, observa-se que o pH manteve os 3 valores a mais que os outros frutos, e o risco associado.

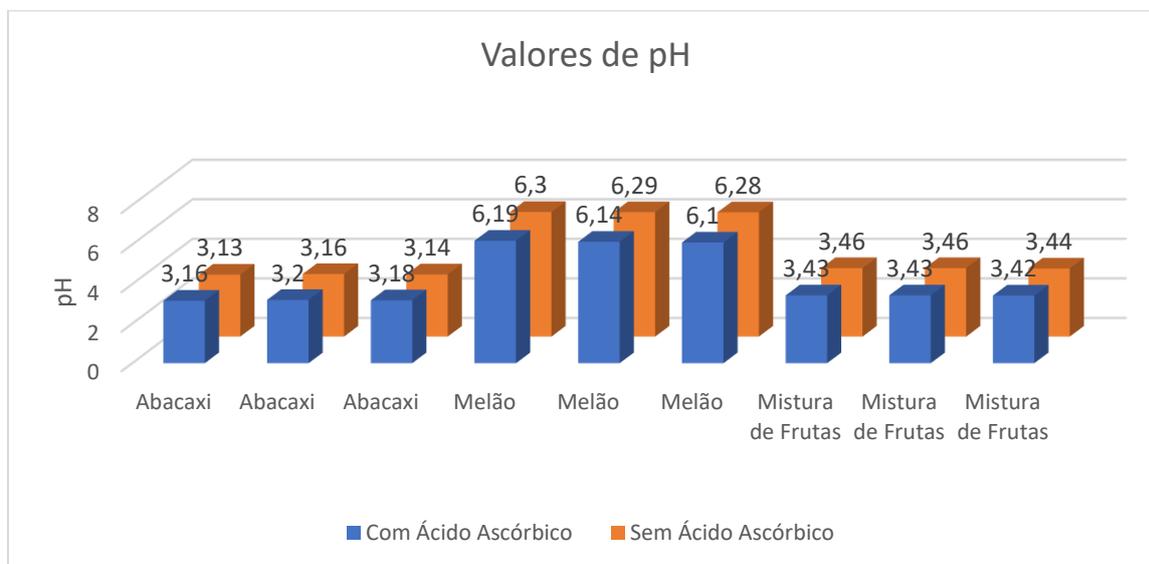


Gráfico 3 - Valores de pH para cada amostra de fruta com e sem filme alimentar.

Como é possível verificar no gráfico 3, o pH das amostras mostrou diferenças muito ligeiras, independentemente, do uso ou não do ácido ascórbico. Daí pode-se concluir que, neste caso de estudo, o ácido ascórbico não mostrou ter influência no pH natural da fruta. No entanto, o seu uso é de extrema importância devido às alterações decorrentes na fruta, das quais se destacam a alteração da cor, textura do fruto e cheiro.

A tabela 12 mostra o pH das amostras com ácido ascórbico, já com o período de vida útil ultrapassado.

Tabela 12 - Valores de pH das amostras com ácido ascórbico, com período de vida útil ultrapassado.

Amostras	Período de vida útil	pH
Abacaxi	Aberto no último dia de validade	3,11
Abacaxi	+2 dias	3,05
Melão	+2 dias	5,75
Melão em calda	Aberto no penúltimo dia	5,83
Mistura de frutas (Abacaxi, meloa, manga e uva)	Aberto no último dia de validade	4,23

Mistura de frutas (Abacaxi, meloa, manga e uva)	+ 2 dias	4,21
---	----------	------

Na tabela 12 verificam-se alguns valores de pH. O abacaxi em período de vida útil ultrapassado apresenta um pH inferior ao pH das amostras dentro da validade. O mesmo se verifica no melão e no melão em calda, que mostram valores de pH inferiores aos valores encontrados nas amostras dentro da validade. No caso das amostras de mistura de frutas verifica-se um valor superior em comparação com as amostras dentro da validade.

8.3. Temperatura das amostras

No gráfico 4 observa-se o registo das temperaturas das três amostras de cada fruta com (CF) e sem filme (SF) alimentar.

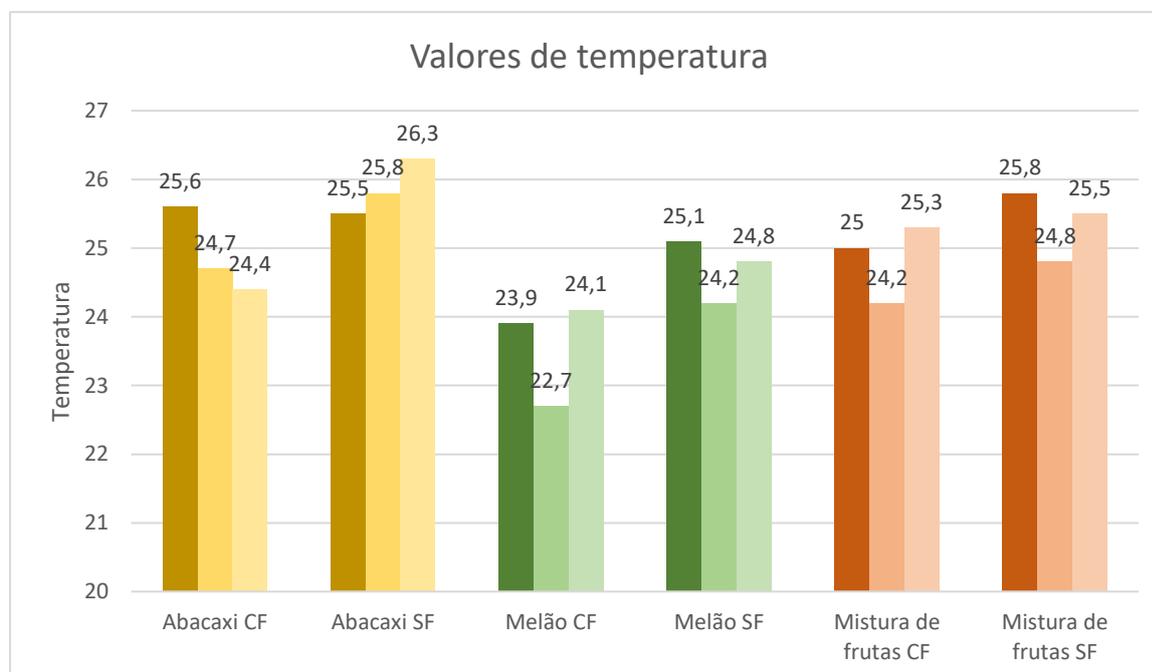


Gráfico 4 - Registo das temperaturas das três amostras de cada fruta com (CF) e sem filme (SF) alimentar.

A tabela 13 mostra os registos de temperatura efetuados nas amostras de frutas com período de vida útil ultrapassado.

Tabela 13 - Registos de temperatura efetuados às amostras de frutas com período de vida útil ultrapassado.

Amostras	Período de vida útil	Temperatura
Abacaxi	Aberto no último dia de validade	25,1 °C
Abacaxi	+2 dias	25 °C
Melão	+2 dias	25,3 °C
Melão em calda	Aberto no penúltimo dia	23,1 °C
Mistura de frutas (Abacaxi, meloa, manga e uva)	Aberto no último dia de validade	26,1 °C
Mistura de frutas (Abacaxi, meloa, manga e uva)	+ 2 dias	24,8 °C

Na tabela 13 observam-se as várias medições de temperatura. O abacaxi, esteve sempre á mesma temperatura, mostrando uma ligeiríssima diferença de 0,1°C. Já o melão mostra uma diferença de 2,2°C de temperatura entre a amostra aberta no limite da validade e dois dias depois. No que concerne à mistura de fruta, observa-se uma diferença de 1,3°C. Apesar de se verificarem estas diferenças, não é possível associá-las ao tipo de fruta em uso, uma vez que, depois de retiradas do frio, não houve qualquer controlo de tempo e temperatura até à realização da medição de temperatura.

8.4. Classificação

Segundo as diretrizes do Regulamento (CE) nº 2073/2005, cada microrganismo deve cumprir determinados requisitos de forma a que os alimentos se apresentem com qualidade e segurança para o consumidor. De acordo com o referido Regulamento, os resultados obtidos nas análises das amostras de fruta deverão revelar ausência de *Salmonella* em 25 g, 100 ufc/g a 1000 ufc/g de *E.coli*, e < 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes*. Estão incluídas as frutas que não sejam suscetíveis a *Listeria monocytogenes*, que tenham um período de vida útil inferior a 5 dias, com pH ≤ 4,4 e a_w ≤ 0,92 ou pH ≤ 5,0 e a_w ≤ 0,94.

Neste trabalho não se realizaram análises microbiológicas, antes pretendeu-se estabelecer o nível de risco da presença ou potencial desenvolvimento de *Listeria*

monocytogenes, *E.coli* e *Salmonella* , em função dos valores de pH e a_w das frutas em estudo, bem como da temperatura a que estavam expostas. É de salientar que obteve-se estes resultados dentro do período de vida útil de 5 dias.

Comparando as necessidades de cada microrganismo com as características de cada fruta, percebe-se que existem defesas naturais na fruta capazes de impedir o crescimento de microrganismos.

Na tabela 14 a fruta irá ser classificada perante o possível risco que apresenta em relação ao seu pH e ao pH de crescimento ótimo do microrganismo. O valor de pH apresentado, é o resultado da média dos valores obtidos nas amostras.

Tabela 14 – Classificação de risco de desenvolvimento microbiológico segundo o pH.

Microrganismo	pH ideal de crescimento	Fruta	pH da fruta	Classificação
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,3 a 9,4	Abacaxi	3,18	Risco mínimo
		Melão	6,14	Risco elevado
		Mistura de Frutas	3,43	Risco mínimo
<i>E.coli</i>	4,4 a 10	Abacaxi	3,18	Risco mínimo
		Melão	6,14	Risco elevado
		Mistura de Frutas	3,43	Risco mínimo
<i>Salmonella</i>	4,5 a 9,3	Abacaxi	3,18	Risco mínimo
		Melão	6,14	Risco elevado
		Mistura de Frutas	3,43	Risco mínimo

O intervalo de pH para ocorrer desenvolvimento de microrganismos é amplo. Contudo, o desenvolvimento dos mesmos não ocorre da mesma forma nos extremos do intervalo em relação ao valor médio. Neste caso, os microrganismos têm um crescimento ótimo ou ideal perto do valor neutro (7). De forma a obter-se uma rápida e fácil leitura do risco que a fruta em estudo apresenta, optou-se por criar uma tabela e inserir 3 categorias que visam identificar o risco perante os microrganismos: Risco mínimo para amostras com pH igual ou inferior a 4 (≤ 4) apresentado na cor verde; Risco médio para amostras com pH igual ou superior a 4 (≥ 4) e igual ou inferior a 6 (≤ 6) apresentado na cor laranja; Risco elevado para amostras com pH igual ou superior a 6 (≥ 6) apresentado na cor encarnado. É possível constatar que o abacaxi e a mistura de frutas apresentam um risco mínimo para o crescimento de microrganismos,

enquanto o melão apresenta um risco elevado para um possível crescimento dos microrganismos.

Na tabela 15 a fruta está classificada perante o possível risco que apresenta em relação à sua a_w e à a_w de crescimento do microrganismo.

Tabela 15 - Classificação de risco de crescimento microbiológico segundo o a_w .

Microrganismo	a_w mínima para ocorrer crescimento	Fruta	a_w da fruta ^{*1}	Classificação
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,92	Abacaxi	0,988	Risco elevado
		Melão	0,989	Risco elevado
		Mistura de Frutas	0,98	Risco elevado
<i>E.coli</i>	0,95	Abacaxi	0,988	Risco elevado
		Melão	0,989	Risco elevado
		Mistura de Frutas	0,98	Risco elevado
<i>Salmonella</i>	0,93	Abacaxi	0,988	Risco elevado
		Melão	0,989	Risco elevado
		Mistura de Frutas	0,98	Risco elevado

*1 - Fonte: Chirife J, Fontan C. F. 1982.

Pela tabela 15 constata-se que pelos valores de a_w as frutas se encontram em risco elevado de desenvolvimento microbiano. Ou seja, as frutas que apresentarem um valor de a_w superior ao valor de a_w mínimo para ocorrer crescimento de microrganismos são consideradas de risco elevado, pois o desenvolvimento de microrganismos irá potencialmente acontecer.

Na tabela 16, a fruta será classificada tendo em conta o risco que apresenta relativamente à sua temperatura e à temperatura ótima de crescimento dos microrganismos.

Tabela 16 - Classificação de risco de crescimento microbiológico segundo a temperatura.

Microrganismo	Temperatura ótima de crescimento	Fruta	Temperatura da fruta	Classificação
<i>Listeria monocytogenes</i>	30 a 37°C	Abacaxi	24,9	Risco elevado
		Melão	23,6	Risco elevado
		Mistura de Frutas	24,8	Risco elevado
<i>E.coli</i>	35 a 37°C	Abacaxi	24,9	Risco elevado
		Melão	23,6	Risco elevado
		Mistura de Frutas	24,8	Risco elevado
Salmonella	38°C	Abacaxi	24,9	Risco elevado
		Melão	23,6	Risco elevado
		Mistura de Frutas	24,8	Risco elevado

A temperatura apresentada é o resultado da média da temperatura das amostras. Apesar de se verificar que as temperaturas das amostras se encontram cerca de 10°C abaixo da temperatura ótima de crescimento, é importante mencionar que todos os microrganismos em questão têm a capacidade de se multiplicar num grande espetro de temperatura.

Por último, as amostras em estudo estão inseridas na categoria de produtos frescos prontos para consumo e apresentam um período de vida útil de 5 dias. Com a devida refrigeração e este período de vida útil estabelecido, é possível controlar de forma adequada a qualidade microbiológica das amostras.

9. Discussão dos Resultados

Nas últimas décadas as frutas minimamente processadas tornaram-se cada vez mais populares, tendo vindo a ganhar espaço como importantes componentes de uma dieta mais saudável. Este aumento do consumo despertou, naturalmente, o interesse na qualidade nutricional, sensorial e microbiológica destes alimentos (Alarcón-Flores et al. 2014; São José et al. 2014).

Atualmente, o processamento mínimo que é aplicado a frutas, na escala industrial, envolve processos que incluem a lavagem inicial, o descasque, o corte das frutas, nova lavagem, embalagem e armazenamento (Laurila and Ahvenainen, 2000). No entanto, todas estas fases, se não forem realizadas seguindo corretamente as regras de higiene e segurança, são passíveis de potenciar o aparecimento de microrganismos. As frutas frescas, em especial, são bastante suscetíveis a uma variedade de microrganismos que tanto podem causar degradação como problemas de saúde ao consumidor. Para minimizar o risco de se comercializar produtos contendo populações eventualmente consideráveis de microrganismos potencialmente prejudiciais para os seres humanos, devem ser implementadas medidas preventivas (Abadias et al. 2008).

De um modo geral, a sobrevivência, o crescimento e multiplicação de microrganismos nas frutas frescas depende de vários fatores, que podem ser intrínsecos, se estiverem associados ao próprio alimento (como o pH e o a_w) ou extrínsecos quando associados ao ambiente que o rodeia (como a temperatura) e aos processos utilizados desde a sua germinação até chegar ao local de preparação (European Commission, 2002).

Posto isto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar e categorizar o risco presente nas frutas frescas prontas para consumo. Para tal fez-se a medição de dois parâmetros, o pH e a temperatura, na fruta já nos últimos dias de validade e quando esta está já ultrapassada pelo menos dois dias. Comparou-se a a_w da fruta com a capacidade de crescimento das bactérias consoante essa a_w .

O abacaxi com o período de vida útil ultrapassado apresenta um pH inferior ao pH das amostras dentro da validade. O mesmo se verifica no melão e no melão em calda, uma diminuição do pH em relação às amostras dentro da validade. O uso de cloreto de cálcio (E509) pode ter influenciado os valores, tornando as frutas mais ácidas. Contudo, a diferença é relativamente baixa e, concomitantemente, o período de vida útil encontra-se ultrapassado ou no limite, que pode influenciar igualmente nos valores de pH. No caso das amostras de

mistura de frutas verifica-se um aumento de um valor em comparação com as amostras dentro da validade. Este aumento de pH não pode ser comparado diretamente com as amostras de mistura de frutas dentro da validade, uma vez que as amostras são compostas por frutas diferentes e por quantidades de frutas diferentes. Logo, estes valores mostram a importância da escolha da fruta a usar no nosso produto como também a importância de escolher a fruta a usar em maior quantidade, no caso de mistura de frutas. Estes dois pontos, interferem na higiene e segurança do alimento. Ou seja, ao escolher o uso de determinada fruta, pode-se inibir ou controlar o crescimento de alguns microrganismos.

Estes resultados vão ao encontro do que foi referido por Jay (2005) que destaca a importância que o pH tem em muitas frutas, funcionando como uma proteção, nomeadamente, nas frutas ácidas como o abacaxi, com valores abaixo do pH de crescimento de vários microrganismos, sendo uma grande influência no que concerne à microbiologia destes produtos. Há que referir que as frutas, por possuírem maiores quantidades de açúcar e pH mais ácidos (geralmente 4,6 ou menos) vão desfavorecer o crescimento de bactérias que não sejam bactérias lácticas, prevalecendo, nestes alimentos, o crescimento de fungos (Porte and Maia, 2001). Assim, sempre que possível, recomenda-se a redução do pH nos alimentos, de forma a melhorar a sua conservação do ponto de vista microbiano. Na tentativa de aumentar a estabilidade dos alimentos, é importante manter a água/pH com ou ligeiramente abaixo da neutralidade (pH 6,5-7,0) (Barth et al. 2009).

No que concerne à a_w os valores mostraram que as frutas em questão se encontram em risco elevado de desenvolvimento microbiano uma vez que apresentam um valor de a_w superior ao valor de a_w mínimo para ocorrer crescimento de microrganismos. O a_w diz respeito à quantidade de água disponível no fruto para que o crescimento microbiano ocorra.

A a_w das frutas vai ser um fator determinante, então, no seu potencial de deterioração, sendo que, a desidratação é usada desde sempre como forma de aumentar a validade útil de diversos alimentos. A fruta é uma classe de alimentos com a_w altos, apresentando uma maior tendência para se deteriorarem mais rapidamente do que aqueles que apresentam baixo conteúdo de água disponível. A diminuição da a_w na fruta é, portanto, importante, uma vez que diminui a velocidade de multiplicação microbiana, assim como afeta de forma negativa o teor final da população. Tal acontece porque, uma vez que as atividades metabólicas dependem da presença de água, estas vão ficar irremediavelmente afetadas (Pinto, Landgraf and Franco, 2018).

A redução da a_w dos produtos alimentícios pode ser obtida por diversos mecanismos como a desidratação pelo calor (secagem), desidratação a frio e a vácuo pelo processo de liofilização, adição de solutos como sal ou açúcar, entre outros.

Por fim, a temperatura também aparece como um fator de risco elevado relativamente às amostras analisadas, sendo este um fator extrínseco aos alimentos. Apesar dos resultados mostrarem que as amostras se encontram 10°C abaixo da temperatura ótima de crescimento, deve-se referir que os microrganismos em estudo se multiplicam num amplo espetro de temperaturas. No entanto, quanto mais altas as temperaturas, mais propensão existe para o desenvolvimento de microrganismos na fruta. Assim, devem ser selecionados métodos de refrigeração adequados para impedir o crescimento microbiano (Barth et al. 2009). A temperatura de armazenamento representa, assim, um importante fator extrínseco para a segurança de produtos alimentares, nomeadamente, de frutas, evitando o crescimento de microrganismos. Tendo em conta que estes microrganismos se reproduzem a uma velocidade considerável à temperatura ambiente, o ideal é conservar as frutas, durante o armazenamento, abaixo dos 5°C.

O controlo na medição da temperatura das amostras foi mínimo. Não houve o acompanhamento rigoroso da temperatura desde o início do processamento da fruta até ao momento da realização do estudo da temperatura, nem a contabilização do tempo que demorou todo esse processo. O controlo mínimo realizado passou por minimizar o impacto da temperatura ambiente alta evitando o contacto direto com o sol e a redução do tempo de exposição da fruta à temperatura ambiente. O estudo da temperatura vem reafirmar a sua importância mas não foi, de todo, o fator em destaque.

9.1. Recomendações

A discussão dos resultados obtidos leva ao desenvolvimento das presentes recomendações, tendo como base o plano HACCP, para a preparação das frutas a ser comercializadas, de modo que o risco de desenvolvimento de microrganismos seja prevenido, apostando assim na qualidade e na segurança para os consumidores.

1) Receção das Frutas

Na receção de fruta fresca devem ser verificadas as seguintes características:

- A fruta deve estar inteira;
- Deve ter um aspeto saudável;

- Textura firme;
- O calibre da fruta;
- A sujidade;
- Existência de ataques de parasitas;
- Presença de humidade por condensação;
- Odor e/ou sabor;
- Verificar a temperatura: nos produtos refrigerados de 1 a 5°C; nos produtos não refrigerados de 6 a 10°C.

A fruta deve ser rejeitada sempre que se observe sinais de podridão, estado de maturação excessiva, sinais de perda de água, danos mecânicos e danos pelo frio.

2) Armazenamento

A armazenagem da fruta fresca deve ser feita com recurso a refrigeração, com temperaturas entre os 7º e os 10º. Devem ser registados todos os produtos que entram e saem do armazém, respeitando o princípio FIFO: First In, First Out - primeiro a entrar é o primeiro a sair.

3) Preparação e Embalamento

Muitas intoxicações alimentares têm a sua génese em procedimentos incorretos de higienização na fase da preparação e manipulação dos alimentos. Deste modo, na preparação da fruta, recomendam-se alguns cuidados:

1. Rejeitar as partes velhas e pisadas;
2. Lavar com água corrente a casca/pele da fruta, de forma a remover todas as poeiras e outros possíveis contaminantes presentes;
3. Mergulhar os frutos numa solução desinfetante de cloro ativo: em primeiro lugar deve-se diluir o produto em água, numa concentração entre 0,5-1%. Deve-se deixar a solução atuar entre 5 a 10 minutos, lavando depois, novamente, os frutos, com água abundante;
4. Remover a casca;
5. Cortar os frutos em cubos;
6. Mergulhar os frutos numa solução alimentar (aditivo alimentar). Deve-se deixar a solução atuar entre 5 a 10 minutos.
7. As várias frutas são pesadas nas quantidades apropriadas para a embalagem/tipo de mistura pretendida;

8. Encher as embalagens com o produto final e colocar as tampas para o fecho das embalagens;
9. Colocar o rótulo e a respetiva codificação. A rotulagem compreende a descrição do lote, designação do produto, condições de conservação e transporte, informação do produtor, peso, validade e ingredientes.

4) Armazenamento Final e Envio

A fruta embalada deve ser armazenada apropriadamente, em câmara de refrigeração, até ser expedida. O produto final deve ser enviado num veículo refrigerado, sendo que, deve ser acondicionado logo que possível no frigorífico para posterior venda.

Por fim, vão ser ainda apresentadas as características desejáveis para o local onde é feita a preparação da fruta, desde a sua manutenção geral, superfícies de trabalho, utensílios e equipamentos, entre outros:

- **Estabelecimento em geral:** as instalações devem ser mantidas limpas e em boas condições, e devem permitir uma manutenção e limpeza adequada. Deve-se fazer um regular controlo parasitário. Devem ser mantidas as boas condições de armazenamento e manuseamento, a temperaturas controladas e registadas;
- **As superfícies de trabalho:** que entram em contacto direto com os alimentos deverão ser sólidas, duráveis e fáceis de limpar. Deverão ser feitas de um material liso, não absorvente e ser inertes aos alimentos, detergentes e desinfetantes nas condições normais de trabalho;
- **Utensílios e equipamentos:** que entrem em contato com os alimentos devem estar limpos, desinfetados, em boas condições de arrumação e em bom estado de conservação;
- **Resíduos alimentares:** devem ser depositados em contentores próprios para o efeito e fechados, para serem recolhidos posteriormente por empresas certificadas, respeitando o ambiente;
- **Paredes:** todas as paredes e divisórias deverão ser de material impermeável, não tóxico, deverão ser lisas até uma altura apropriada para as atividades que aí se realizam, devendo sempre ser mantidas em boas condições de conservação;
- **Pavimentos:** os soalhos deverão ser construídos de material impermeável e de modo a permitir uma limpeza e escoamento adequados;

- **Tetos:** os tetos e estruturas suspensas deverão ser construídos e ter acabamentos de forma a reduzir ao mínimo a acumulação de sujidade, bolores e condensação de vapores, bem como o desprendimento de partículas nos géneros alimentícios;
- **Ventilação:** deve ser natural sempre que possível, ou então mecânica (ar condicionado) com uma limpeza frequente de filtros ou a sua substituição;
- **Janelas:** as janelas deverão ser construídas de modo a serem facilmente limpas, a que se reduza ao mínimo a acumulação de sujidade, estando equipadas com redes contra insetos laváveis e removíveis. Quando necessário as janelas deverão ser fixas;
- **Portas:** deverão ser de um material liso e não absorvente e, quando necessário, de fácil desinfeção;
- **Lâmpadas:** a iluminação deve ser adequada e suficiente para um ambiente de trabalho seguro; as lâmpadas devem ser protegidas com armaduras de forma a evitar a sua queda em caso de rebentamento e essa proteção deve ser facilmente amovível para efetuar a sua higienização;
- **Torneiras:** devem estar em boas condições de utilização, ter água potável quente e/ou fria, devem estar sempre limpas e desinfetadas para serem adequadas ao fim que se destinam.

No processamento mínimo de fruta há ainda que ter em consideração os seguintes pontos críticos:

Tabela 17 - Pontos críticos no processamento mínimo de fruta.

Passo crítico operacional	Perigos	Pontos críticos de controlo	Medidas preventivas e de controlo
Lavagem	Contaminação pela água	Água Práticas de lavagem	Usar sempre água potável e fazer análises rotineiras Controlo da contaminação através do uso de soluções antimicrobianas
Controlo	Contaminação cruzada	Enxaguamento Controladores	Não encher demais os tanques de lavagem/ mudar a água periodicamente Remover todo o excesso de água Empregar controladores com experiência na inspeção do produto

Embalagem	Crescimento microbiano	Transportador de luz	<p>Providenciar iluminação adequada</p> <p>Limpar e desinfetar periodicamente</p> <p>Escolher corretamente a permeabilidade do filme</p>
		Filme alimentar	<p>Analisar a composição dos gases</p> <p>Utilização de filmes impregnados de fungicida</p> <p>Utilização de filmes com propriedades anti embaciamento</p>
Armazenamento/ Distribuição	Crescimento e disseminação de microrganismos	Humidade relativa e controlo de temperatura	<p>Vigiar a temperatura do produto e do armazém regularmente</p> <p>Manter a temperatura entre os 0 e os 5°C</p>
		Controlo de temperatura	<p>Prevenir condensação através de um controlo de temperatura apropriado</p> <p>Ter em consideração o efeito da luz (composição gasosa)</p>
		Iluminação	<p>Providenciar rotulagem com instruções para as condições de armazenamento</p>
		Prática de consumo	

Fonte: Laurila and Ahvenainen, 2000.

Assim, durante o processo, considerando estes pontos críticos, existe a redução dos efeitos que os fatores intrínsecos e extrínsecos da fruta podem ter na facilitação do crescimento de microrganismos.

10. Conclusão

São várias as estratégias existentes para aumentar a estabilidade dos produtos alimentares, onde se incluem a manutenção das suas propriedades sensoriais e nutricionais, assim como a sua durabilidade, diretamente relacionada com o prazo de validade. Nestas estratégias encontram-se diversos métodos de conservação, tendo como finalidade principal mitigar as alterações indesejáveis, sejam elas de que natureza for.

Assim, e tendo em conta a tecnologia escolhida, o objetivo é a conservação dos alimentos pelo maior tempo possível, evitando assim perdas associadas quer à sazonalidade quer a um processo de manipulação, preparação e abastecimento deficiente. Uma das principais razões para a deterioração dos alimentos prende-se com a presença de microrganismos.

Estes microrganismos dependem de condições favoráveis para a sua multiplicação, nomeadamente, de pH e de a_w (fatores intrínsecos dos alimentos) e a temperatura (fator extrínseco), que foram os parâmetros avaliados no presente trabalho.

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar e categorizar o risco presente nas frutas frescas prontas para consumo. Para tal fez-se a medição de três parâmetros, o pH, a a_w e a temperatura, na fruta já nos últimos dias de validade e quando esta está já ultrapassada pelo menos dois dias.

No estudo do pH foi possível verificar qual era a acidez presente nas frutas e que diferenças existem utilizando ou não o ácido ascórbico. Conclui-se que a escolha das frutas a usar para estes fins deve-se basear no seu pH, pois tem um papel importante na proteção para o consumidor. Quanto mais baixo for o pH mais seguro é para o consumidor, uma vez que o desenvolvimento de microrganismos é menor ou nulo. O uso do ácido ascórbico encontra-se reservado para manter as qualidades organoléticas dos frutos. O seu uso não é capaz de alterar o pH da fruta pois está definido o limite de consumo diário. Em excesso, pode alterar o sabor e cheiro das frutas ou, mais importante, provocar doença ao consumidor.

A medição do pH no decurso do processo deve ser considerada um ponto crítico de controlo quando existe mistura de frutas, uma vez que se verifica que a quantidade de cada fruto interfere no pH da mistura.

A a_w das frutas é uma característica importante para o desenvolvimento de microrganismos. Como foi observado, todas as frutas apresentam um valor de a_w alto, o que

poderia tornar-se um risco para o seu consumo. Os microrganismos em estudo apresentam desenvolvimento nos valores a_w apresentados. Esta característica não pode ser alterada pois o produto final depende dela. Desta forma, é uma característica que se tem de manter.

Após o estudo destas duas categorias, pH e a_w , conclui-se que a fruta deve ser criteriosamente escolhida. Ao nível da a_w , todas as frutas mostraram ter um valor alto, eliminando assim as categorias presentes na hipótese. O mesmo se observa no pH, existem frutas que são adequadas para determinada categoria, mas outras não. Desta forma, as frutas minimamente processadas devem ser avaliadas separadamente.

Constata-se que a temperatura em análise não alterou o pH ou o ácido ascórbico, tendo em conta o período do estudo. É importante referir que as amostras se apresentam à temperatura ambiente, tendo sido produzidas durante o Verão. O controlo deste fator foi mínimo, apenas o essencial para simular um ambiente comum ao público-alvo. Poderá ser interessante aprofundar o estudo dos efeitos da temperatura e avaliar, concomitantemente, os critérios microbiológicos referentes aos microrganismos estudados nesta dissertação.

Observaram-se também mudanças interessantes nas amostras com prazo de validade ultrapassado, mudanças essas que podem promover o crescimento microbiano. Ao consumir alimentos com a data de validade ultrapassada, o consumidor pode expor-se a microrganismos potencialmente nocivos e que podem ter consequências graves na sua saúde.

Na classificação de risco das amostras perante os microrganismos determinados, foi possível observar os riscos presentes nas frutas em estudo e o desenhar de um cenário possivelmente desastroso, caso não haja cuidados prévios. São várias as recomendações existentes para o manuseamento e preparação de produtos alimentares minimamente processados, de modo a manter a sua qualidade e segurança para o consumidor.

11. Referências Bibliográficas

- Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 121–129. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013
- Alarcón-Flores M, Romero-González R, Martínez Vidal J, Egea González F, Garrido A. 2014. Monitoring of phytochemicals in fresh and fresh-cut vegetables: A comparison. *Food Chemistry*. 142: 392–399. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.065
- Allende A, McEvoy JL, Luo Y, Artes F, Wang CY. 2006. Effectiveness of two-sided UV-C treatments in inhibiting natural microflora and extending the shelf-life of minimally processed “Red Oak Leaf” lettuce. *Food Microbiology*. 23(3). doi:10.1016/j.fm.2005.04.009.
- Alonzo AG. 2008. Estimation of water activity from pH and Brix values of some food products. *Food Chemistry*, 108, 1106–1113. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.077.
- Annous B, Gurtler J. 2012. *Salmonella - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*. London: Intech Open.
- Aoshi T, Carrero JA, Konjufca V, Koide Y, Unanue ER, Miller MJ. 2009. The cellular niche of *Listeria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. *European Journal of Immunology*. 39(2). doi: 10.1002/eji.200838718.
- Asae: Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. 2008. [acedido em 2021 Mar 15] <https://www.asae.gov.pt/noticias> .
- Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L, Salmaso S. 2000. Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Corn Contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New England Journal of Medicine*. 342(17). doi:10.1056/NEJM200004273421702.
- Baptista P, Noronha J, Oliveira J, Saraiva, J. 2003. *Modelos Genéricos de HACCP*. Guimarães: Forvisão- Consultoria em formação integrada, Lda.
- Baptista P, Venâncio A. 2003. *Os perigos para segurança alimentar no processamento de alimentos*. Guimarães: Forvisão - consultoria em formação integrada., Lda.
- Barth M, Hankinson TR, Zhuang H, Breidt F. 2009. Microbiological Spoilage of Fruits and Vegetables. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, 135–183. doi:10.1007/978-1-4419-0826-1_6
- Bastos MSR. 2006. *Frutas minimamente processadas: Aspectos de Qualidade e Segurança*. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE. [acedido em 2022 Jan 05] <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes> .
- Bell C, Kyriakides A (Eds.). 2001. *Salmonella*. doi:10.1002/9780470999455.
- Bell C, Kyriakides A. 2009. *Listeria monocytogenes*. In: *Foodborne Pathogens*. Elsevier.
- Bhagavan NV. 2001. *Medical Biochemistry*. Amsterdam: Elsevier.

- Bhat SA, Willayat MM, Roy SS, Bhat MA, Shah SN, Ahmed A, Maqbool S, Ganayi BA. 2013. Isolation, molecular detection and antibiogram of *Listeria monocytogenes* from human clinical cases and fish of Kashmir, India. *Comparative Clinical Pathology*. 22(4). doi:10.1007/s00580-012-1462-1.
- Bolton DJ, Maunsell B. 2006. Guia para o controlo da Segurança Alimentar em restaurantes europeus. Lisboa: Laboratório de Microbiologia dos Alimentos – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
- Brito L. 2003. *Listeria*, listeriose, histeria e neurose. *Ingenium*. 2(78): 66-69.
- Brouwer MC, Beek D v. d., Heckenberg SGB, Spanjaard L, Gans J d. 2006. Community-Acquired *Listeria monocytogenes* Meningitis in Adults. *Clinical Infectious Diseases*. 43(10). doi:10.1086/508462.
- Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*. 75. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.016.
- Buettner GR. 1986. Ascorbic acid antioxidation in the presence of iron and copper chelates. *Free Rad Res Commun*. 1: 349–353.
- CAC. 2003a. Codex Alimentarius Commission, CAC/RCP 1-1969, Rev. 4. Rome: FAO
- CAC. 2003b. Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables (CAC/RCP 53-2003). Rome: FAO.
- Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. 2013. Neonatal Infectious Diseases. *Pediatric Clinics of North America*. 60(2). doi: 10.1016/j.pcl.2012.12.003.
- Cathcart RF. 1991. A unique function for ascorbate. *Med Hypotheses*. 35(1):32-7. doi: 10.1016/0306-9877(91)90080-i.
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention. 2011. [acedido em 2021 Mar 15]. <https://www.cdc.gov/ecoli/general/germany.html>
- Chirife J, Fontan C. F. 1982. Water Activity of Fresh Foods. *Journal of Food Science*, 47(2), 661–663. doi:10.1111/j.1365-2621.1982.tb10145.x
- Christian, J. 1980. Actividad de agua reducida. In: Siliker, J.; Elliott, R.; BairdParker, A.; Bryan, F.; Christian, J.; Clark, D.; Olson, J. & Roberts, T. – *Ecología microbiana de los alimentos*. Volumen I. Factores que afectan la supervivência de los microorganismos en los alimentos. 1ª Edición Española. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.. ISBN 84-200-0519-3. pp. 74-96.
- Chua D, Goh K, Saftner RA, Bhagwat AA. 2008. Fresh-cut lettuce in modified atmosphere packages stored at improper temperatures supports enterohemorrhagic *E. coli* isolates to survive gastric acid challenge. *Journal Food Science*. 73(3):M148-53. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00698.x.
- Coles R, Kirwan MJ. 2011. Food and beverage packaging technology. Londres: Wiley-Balackwell.

- Cone LA, Leung MM, Byrd RG, Annunziata GM, Lam RY, Herman BK. 2003. Multiple cerebral abscesses because of *Listeria monocytogenes*: three case reports and a literature review of supratentorial listerial brain abscess(es). *Surgical Neurology*. 59(4). doi:10.1016/S0090-3019(03)00056-9.
- Corlett DA. 1998. HACCP User's Manual. London: Springer.
- Crum-Cianflone NF. 2008. Salmonellosis and the gastrointestinal tract: More than just peanut butter. *Current Gastroenterology Reports*, 10(4), 424–431. doi:10.1007/s11894-008-0079-7.
- Davis DE, Stewart H. 2002. Changing consumer demands create opportunities for US food system. *Food Rev./Natl. Food Rev.* 25 (1): 19–23.
- Desmarchelier PM, Fegan, N. 2003. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Ch 9. In: Hocking AD, editor. *Foodborne microorganisms of public health significance*. Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch); p. 267–310.
- Didelot X, Bowden R, Street T, Golubchik T, McVean G. 2011. Recombination and Population Structure in *Salmonella enterica*. *PLoS Genet.* 7(7): e1002191. doi: doi.org/10.1371/journal.pgen.1002191
- Du J, Cullen J, Buettner G. 2012. Ascorbic acid: Chemistry, biology, and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1826(2):443-57. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.06.003.
- Edwards M. 2004. Identifying foreign bodies. In: M. Edwards M, editor. *Detecting foreign bodies in food*. England: Woodhead publishing Ltd; p.282-296.
- Erdurak-Kilic CS, Uslu B, Dogan B, Ozgen U, Ozkan S, Coskun, M. 2006. Anodic voltammetric behavior of ascorbic acid and its selective determination in pharmaceutical dosage forms and some *Rosa* species of Turkey. *J. Anal. Chem.* 61: 1113-1120.
- ESBUC. 2016. Segurança alimentar. Riscos biológicos. *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. Escola Superior de Biotecnologia. Universidade Católica, (ESBUC). [acedido em 2020 mai 10]. <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos>
- Escherich T. 1988. The Intestinal Bacteria of the Neonate and Breast-Fed Infant. *Clinical Infectious Diseases*, 10(6), 1220–1225. doi:10.1093/clinids/10.6.1220
- European Commission. 2002. Risk Profile on the Microbiological Contamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw: Report of the Scientific Committee on Food. Bruxeles: European Commission.
- Eurostat. 2019. The statistical office of the European Union. European Commission, Eurostat, Products Eurostat News, Do you eat fruit and vegetables daily? [acedido em 2020 Set 09]. <https://ec.europa.eu/eurostat/en/web/products-eurostat-news/-/DDN-20190401-1>
- Fellows PJ. 2006. *Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática* São Paulo: Artmed.
- Ferreira WFC, Sousa JCF, Lima N. 2010. *Microbiologia*. Lisboa: LIDEL

- Food and Drug Administration. 2012. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition.
- Food Navigator: News & Analysis on Food & Beverage Development – Europe. 2017. [acedido em 2021 Mar 15] <https://www.foodnavigator.com/Article/2017/06/19/Consumer-perceptions-after-Mars-chocolate-recall>
- Food Safety Brazil. 2014. [acedido em 2021 Mar 15] <https://foodsafetybrazil.org/corte-americana-julga-responsaveis-no-caso-de-manteiga-de-amendoim-com-salmonella>
- Forsythe SJ. 2000. The Microbiology of Safe Food. Blackwell Science, Oxford. doi:10.1002/9780470999431
- Forsythe SJ. 2005. Doenças de Origem Alimentar, Microrganismos Causadores de Doenças de Origem Alimentar in Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: Artmed.
- Forsythe SJ. 2013. Microbiologia da segurança dos alimentos – 2. ed. – Porto Alegre: Artmed.
- Fortin M. 2009. Fundamentos e Etapas no Processo de Investigação. Loures: Lusodidática.
- Fox BA, Cameron AG. 1989. Food Science, Nutrition and Health. London: Edward Arnold.
- Foyer CH, Noctor G. 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. Plant Physiol. 155(1): 2-18. doi: 10.1104/pp.110.167569.
- Francis GA, O'Beirne D. 2001. Effects of vegetable type, package atmosphere and storage temperature on growth and survival of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 27(2). doi: 10.1038/sj.jim.7000094.
- Franco D, Landgraf M. 2005. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu.
- Gaschignard J, Levy C, Romain O, Cohen R, Bingen E, Aujard Y, Boileau P. 2011. Neonatal Bacterial Meningitis. Pediatric Infectious Disease Journal. 30(3). doi:10.1097/INF.0b013e3181fab1e7.
- Gaulejac NS, Glories Y, Vivas N. 1999. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. J Agric Food Chem. 47(2):425-431. doi: 10.1021/jf980700b.
- George SM, Lund BM, Brocklehurst TF. 1988. The effect of pH and temperature on initiation of growth of Listeria monocytogenes. Letters in Applied Microbiology. 6(6). doi:10.1111/j.1472-765X.1988.tb01237.x
- Gest N, Gautier H, Stevens R. 2013. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? J Exp Bot. 64(1):33-53. doi: 10.1093/jxb/ers297.
- Goodrich-Schneider R, Schneider KR, Danyluk MD, Schmid RH. 2005. HACCP: Na Overview. [acedido em 2021 Out 23]. <https://journals.flvc.org/edis/article/download/119875/117882>

- Gottlieb SL, Newbern EC, Griffin PM, Graves LM, Hoekstra RM, Baker NL, Hunter SB, Holt KG, Ramsey F, Head M, et al. 2006. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Turkey Deli Meat and Subsequent Changes in US Regulatory Policy. *Clinical Infectious Diseases*. 42(1). doi:10.1086/498113.
- Halliwell B, Gutteridge J. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- Harrigan WF. 2008. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2nd edition. In: *International Journal of Food Science & Technology*. Vol. 36.
- Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RV. 2002. Salmonella surveillance: a global survey of public health sero-typing. *Epidemiol. Infect.* 129(1):1-8. doi: 10.1017/s0950268802006842.
- Hof H, Hefner P. 1988. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection*. 16(S2). doi:10.1007/BF01639737.
- Hsu PF, Ciou WL, Chen PV. 2008. Voltammetric study of polyviologen and the application of polyviologen-modified glassy carbon electrode in amperometric detection of vitamin C. *Journal of Applied Electrochemistry*. 38: 1285–1292.
- Hui, Y. H., Barta, J., Pilar Cano, M., Gusek, T. W., Sidhu, J. S., & Sinha, N. K. (2006). *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. Handbook of Fruits and Fruit Processing (1st ed.). Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd.
- INSA. 2019. Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: valores-guia. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. [Disponível em: <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5610>]
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1996. Microorganisms in foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens. *Food Control*. 7(2):99-101.
- Jay JM. 1992. Spoilage of fruits and vegetables. In: *Modern Food Microbiology* (4th ed.), Chapman and Hall, New York, pp.187–198
- Jay JM. 2005. *Microbiologia de Alimentos*. Porto: Alegre Atmed.
- Jay LS, Davos D, Dundas M, Frankish E, Lightfoot D. 2003. Salmonella. Ch 8 In: Hocking AD (ed) *Foodborne microorganisms of public health significance*. 6th ed, Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch), Sydney, p. 207–266.
- Kalia A, Rajinder PG. 2006. Fruit Microbiology. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of Fruits and Fruit Processing* (1st ed., pp. 3–28). Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2(2). doi: 10.1038/nrmicro818.
- Khoury NT, Hossain MM, Wootton SH, Salazar L, Hasbun R. 2012. Meningitis With a Negative Cerebrospinal Fluid Gram Stain in Adults: Risk Classification for an Adverse Clinical Outcome. *Mayo Clinic Proceedings*. 87(12). doi: 10.1016/j.mayocp.2012.08.016.

- Kilcast D, Subramaniam P. 2000. The Stability and Shelf-Life of Food. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Boca Raton, Washington DC.
- Krist K, Nichols D, Ross T. 2000 – Ecology of bacteria and fungi in foods. Influence of available water In: Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P. – Encyclopaedia of food microbiology. Volume 1. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. pp. 539-547.
- Labuza T, Rahman M. 2007. Water Activity and Food Preservation. [acedido em 2020 Set 09]. http://moisturecontrol.weebly.com/uploads/5/3/5/3/53532707/book_ch2-water_activity_and_food_preservation.pdf
- Lakicevic B, Nastasijevic I, Raseta M. 2015. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in retail establishments. *Procedia Food Science*. 5: 160 – 163. doi: 10.1016/j.profoo.2015.09.046
- Laurila E, Ahvenainen R. 2000. Minimal processing of fresh fruits and vegetables. In Jongen W, editor. *Fruit and vegetable processing improving quality*. Cambridge; Woodhead Publishing Limited; p.288-309
- Leedom Larson KR e Spickler AR. 2013. Salmonelose. Traduzido e adaptado a situação do Brasil por Mendes RE e Sareta L. 2019. [Disponível em <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pt/salmonella-nontyphoidal-PT.pdf>]
- Léger D. 2008. Scurvy: reemergence of nutritional deficiencies. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, 54(10), 1403–1406.
- Leistner L, Gorris L. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Tecnology*. Volume 6, Issue 2, February. pp. 41-46.
- Leistner L, Gould G. 2002 – Hurdle technologies - Combination treatments for food stability, safety and quality. *Food engineering series*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. 194 p.
- Likotrafiti E, Smirniotis P, Nastou A, Rhoades J. 2013. Effect of Relative Humidity and Storage Temperature on the Behavior of *Listeria monocytogenes* on Fresh Vegetables. *Journal of Food Safety*. 33(4). doi:10.1111/jfs.12087.
- Lin C-M, Takeuchi K, Zhang L, Dohm CB, Meyer JD, Hall PA, Doyle MP. 2006. Cross-Contamination between Processing Equipment and Deli Meats by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 69(1). doi:10.4315/0362-028X-69.1.71.
- Maneffa AJ, Stenner R, Matharu AS, Clark J, Matubayasi N, Shimizy S. 2017. Water activity in liquid food systems: A molecular scale interpretation. *Food Chemistry*, 237: 1133–1138. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.046.
- Marshall BM, Levy SB. 2011. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*. 24(4). doi:10.1128/CMR.00002-11.
- Marques A. 2014. Estudo de aplicação, em IPSS'S, de um sistema de segurança alimentar baseado na metodologia HACCP. [dissertação de mestrado]. Coimbra: Universidade de Coimbra.

- Meister A. 1994. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem.* 269(13):9397-9400.
- Meng J, Schroeder CM. 2007. *Escherichia coli*. In: Simjee S, editor. *Foodborne Diseases*. Totowa: Humana Press: p. 1–25.
- Moriel DG, Rosini R, Seib KL, Serino L, Pizza M, Rappuoli R. 2012. *Escherichia coli*: Great Diversity around a Common Core. *mBio.* 3(3). doi:10.1128/mBio.00118-12.
- Moxley R. 2013. Enterobacteriaceae: *Escherichia*. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa M, editors. *Veterinary Microbiology*. Iowa, USA: John Wiley & Sons, Inc; p. 62-74.
- Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology.* 29(4). doi:10.1002/path.1700290409.
- Novais MR. 2006. Noções Gerais de Higiene e Segurança Alimentar – Boas Práticas e Pré-Requisitos HACCP. *Revista Segurança e Qualidade Alimentar.* 1: 10–11.
- NZFSA. 2005. A guide to Calculating the Shelf Life of Foods. S: New Zealand Food Safety Authority. [acedido em 2020 Out 05] <http://www.forma-te.com/finish/64-higiene-e-seguranca-alimentar-haccp/25417-a-guide-to-calculating-the-shelf-life-of-foods>
- Okike IO, Lamont RF, Heath PT. 2013. Do We Really Need to Worry About *Listeria* in Newborn Infants? *Pediatric Infectious Disease Journal.* 32(4). doi: 10.1097/INF.0b013e3182867fa0.
- Olaimat AN, Holley RA. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol.* 32(1):1-19. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.016. Epub 2012 May 8. PMID: 22850369.
- Orsi RH, Den Bakker HC, Wiedmann M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 301(2):79-96. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002.
- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J-H, Chen S. 2003. Vitamin, C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* 22(1):18-35. doi: 10.1080/07315724.2003.10719272.
- Pérez-Trallero E, Zigorraga C, Artieda J, Alkorta M, Marimón JM. 2014. Two Outbreaks of *Listeria monocytogenes* Infection, Northern Spain. *Emerging Infectious Diseases.* 20(12). doi:10.3201/eid2012.140993.
- Pinto U, Landgraf M, Franco B. 2018. Deterioração Microbiana dos Alimentos. [acedido em 2021 Dez 09]. <https://www.abia.org.br/vsn/temp/z2018918ArtigoparaazeitesDeterioracaomicrobianadosalimentos11Set2018....pdf>
- Pisoschi AM, Cheregi MC, Danet Af. 2009. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules.* 14(1):480-93. doi: 10.3390/molecules14010480

- Popa CV, Danet AF, Jipa, S, Zaharescu T. 2010. Determination of total antioxidant activity of wines using a flow injection method with chemiluminescence detection. *Rev. Chim.* 61 (2010): 11.
- Popa CV, Danet AF, Jipa S, Zaharescu T. 2012. Determination of total antioxidant capacity of some fruit juices and noncarbonated soft drinks by a FIA-CL method, *Rev. Chim*, 63 (2012); 978.
- Porte A, Maia L. 2001. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. *B CEEPA*. 19 (1): 105-118.
- Proctor ME, Brosch R, Mellen JW, Garrett LA, Kaspar CW, Luchansky JB. 1995. Use of pulsed-field gel electrophoresis to link sporadic cases of invasive listeriosis with recalled chocolate milk. *Applied and environmental microbiology*. 61(8). doi:10.1128/AEM.61.8.3177-3179.1995.
- Ragaert P, Devlieghere F, Debevere J. 2007. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 44(3). doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.01.001.
- Regulamento (EU) nº 1129/2011 da Comissão de 11 de novembro de 2011.
- Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008
- Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005.
- Reuters. The news and media division of Thomson Reuters. 2007. [acedido em 2021 Mar 15] <https://www.reuters.com/article/us-cadbury-salmonella>
- Ribeiro EP, Seravalli EA. 2007. *Química de Alimentos*. Brasil: Editora Edgard Blücher Ltda.
- Rizzolo A, Polesello S. 1992. Chromatographic determination of vitamins in foods. *J Chromatogr*. 624(1-2); 103-152.
- Rosnes JT, Sivertsvik M, Skåra T. 2003. Combining MAP with other preservation techniques. In: *Novel Food Packaging Techniques*. Elsevier.
- São José J, Andrade N, Ramos, A, Vanetti, C, Stringheta P, Chaves J. 2014. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. *Food Control*. 45: 36-50.
- Schothorst, M. V. 2004. A simple guide to understanding and applying the hazard analysis critical control point concept. Bélgica: The International Life Sciences Institute.
- Scott WJ. 1957. Water Relations of Food Spoilage Microorganisms. *Advances in Food Research*. 7: 83-127.
- Sies H, Stahl W, Sundquist AR. 1992. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*. 669:7-20. doi: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb17085.x.

- Singh TK, Cadwallader, K. 2004. Ways of measuring shelf-life and spoilage. *Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food*. 165-183.
- Smirnoff N, Pallanca JE. 1996. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 24(2):472-278. doi: 10.1042/bst0240472.
- Souza LM, Amaral CAA, Liboredo JC. 2019. Conhecimento de manipuladores de alimentos sobre higiene e condições sanitárias na produção de comida japonesa. *Brazilian Journal of Development*. 5(12). doi:10.34117/bjdv5n12-182.
- Stone I. 1972. The natural history of ascorbic acid in the evolution of mammals and primates and its significance for present-day man. *J. Orthomol. Psychiatry*. 1 (1972): 82.
- Tondo EC. 2020. *Perigos nos alimentos*. São Paulo: Editora Senac.
- Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesus J, Platt DJ, Olsen JE. 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect.* 125(2): 229-255. doi: 10.1017/s0950268899004379
- Valpuesta V, Botella M. 2004. Biosynthesis of l-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant. Sci.* 9(12):573-277. doi: 10.1016/j.tplants.2004.10.002.
- Varela P, Fiszman SM. 2013. Exploring consumers' knowledge and perceptions of hydrocolloids used as food additives and ingredients. *Food Hydrocolloids*. 30 (1): p.477-484. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.07.001.
- Vaz A, Moreira R, Hogg T. 2000. *Introdução ao HACCP*. Porto: Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica.
- Wallace C, Mortimore S. 2013. *HACCP A practical Approach*. New York: Springer.
- Weller D, Andrus A, Wiedmann M, den Bakker HC. 2015. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65(Pt_1). doi:10.1099/ijs.0.070839-0.
- William N, Wilson J, Hazel S, Goetzmann. 2003. Non-typhoidal *Salmonella* in United Kingdom Badgers: Prevalence and spatial distribution. *Appl Environ Microbiol.* 69(7): 4312–4315. doi:10.1128/AEM.69.7.4312-4315.2003.
- Wing EJ, Gregory SH. 2002. *Listeria monocytogenes*: Clinical and Experimental Update. *The Journal of Infectious Diseases*. 185(s1). doi:10.1086/338465.
- World Health Organization. 2005. *Fruit and vegetables for health: report of the Joint FAO/WHO Workshop on Fruit and Vegetables for Health, 1-3 September 2004, Kobe, Japan*. World Health Organization.
- Yan S, Pendrak M, Abela-Ridder B. 2003. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews*. 4(3). 189-204. doi: 10.1016/j.cair.2003.11.002.
- Yeni F, Yavas S, Alpas H, Soyer Y. 2016. Most common foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce: a review of recent outbreaks. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56(9):1532-44. doi: 10.1080/10408398.2013.777021.

Yousef A, Lado B. 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors.