



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO

Avaliação da qualidade microbiológica de produtos alimentares
comercializados em unidades móveis (Roulottes) do grande Porto

Joana Filipa Leite Gil

Porto, 2013

Avaliação da qualidade microbiológica de produtos alimentares comercializados em unidades móveis (Roulottes) do grande Porto

Assessment of microbiological quality of food marketed in mobile sales vehicles in Oporto

Joana Filipa Leite Gil

Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Antunes (FCNAUP)

Dissertação/Relatório de candidatura ao grau de Mestre em Alimentação Coletiva apresentada à Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

2013

Dedicatória

À minha família e amigos

Agradecimentos

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

À minha orientadora Prof. Doutora Patrícia Antunes pelo apoio, disponibilidade, opiniões e críticas que me elucidaram e guiaram na realização deste trabalho;

Aos companheiros e amigos de trabalho, Joana Campos, Joana Mourão, Carla Rodrigues, João Pires, Eduarda Silveira, Cristina Costa e Paulinha, sem esquecer os demais, a quem agradeço desde já o carinho com que me receberam, apoio, sabedoria mas acima de tudo incentivo e amizade que sempre me prestaram tornando assim estes meses bem mais saborosos. Um muito obrigado;

Aos amigos de sempre, Susana Abreu, Sara Sotto-Mayor, João Meneses, Pedro Ribeiro, Diana Isabel, Cuimbra, Pirinhos, Sofia Duarte, Patrick, Marisa Oliveira, Adri, Marta, Luzinha, entre outros que não menciono mas sabem quem são, um muito obrigado pela vossa presença na minha vida, paciência e apoio em todos os momentos.

À minha família por todo o apoio, por acreditarem até ao fim e por todo o amor!

Obrigado a todos!

Resumo

A venda de alimentos de rua designada por venda ambulante teve um crescimento exponencial um pouco por todo o mundo devido a fatores socioeconómicos, culturais e nutricionais. Contudo, apresenta aspetos negativos no que concerne à higiene e segurança alimentar. Assim, foi objetivo deste estudo analisar a qualidade microbiológica de cachorros-quentes e de hambúrgueres em pão prontos a comer vendidos em unidades móveis de restauração, assim como o estado higiénico das mãos dos manipuladores dessas unidades. Foram colhidas 10 amostras de cachorros-quentes, 10 de hambúrgueres em pão e 9 de mãos de manipuladores em 10 roulottes da região do Grande Porto (8 do Porto e 2 de Vila Nova de Gaia). A qualidade microbiológica dos alimentos foi determinada de acordo com métodos de referência internacionais para a contagem de aeróbios mesófilos, contagem de *Enterobacteriaceae*, coliformes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positivo e pesquisa de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. O estado higiénico das mãos dos manipuladores foi avaliado através da contagem de aeróbios mesófilos, contagem/pesquisa de *Enterobacteriaceae*, coliformes, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positivo e pesquisa de *Salmonella*. Os isolados de *E. coli* foram identificados por ensaios de PCR para o rDNA 16S e para determinação dos grupos filogenéticos. Todas as amostras de alimentos analisadas se encontravam “não satisfatórias” para pelo menos dois dos parâmetros (*Enterobacteriaceae* e coliformes). Apesar da ausência de *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positivo em todas as amostras de alimentos, foi detetada *L. monocytogenes* em 4 produtos (20%) obtidos de 3 roulottes. *E.coli* dos grupos filogenéticos A0, A1 e B1 foram detetadas em 13 (65%) alimentos de ambos os tipos, tendo 5 (25%), de 5 roulottes (50%), níveis “não satisfatórios”. O estado higiénico dos manipuladores mostrou-se “não satisfatório” para a presença de *Enterobacteriaceae* e coliformes em todas as amostras e para *E. coli* em 2 dos 9 (22%) e *Staphylococcus* coagulase positivo em 4 dos 9 manipuladores (44%). Este estudo demonstra que os alimentos prontos a comer disponíveis para consumo em 10 unidades de venda ambulante do Grande Porto apresentaram uma má qualidade microbiológica, tal como o estado higiénico dos seus manipuladores. Estes dados reforçam a necessidade de regulamentar a atividade das unidades móveis de restauração, incluindo formação dos manipuladores em higiene e segurança alimentar e melhoria das infra-estruturas, de forma a evitar a transmissão de bactérias potencialmente patogénicas para o Homem através da cadeia alimentar.

Palavras-Chave: unidades móveis de restauração, venda ambulante, segurança alimentar, cachorro-quente, hambúrguer em pão, manipuladores.

Abstract

The sale of street foods also known as street vending has grown exponentially all over the world due to its socio-economic, cultural and nutritional importance. However, it also has negative aspects in relation to food safety and hygiene. The aim of this study was to analyze the microbiological quality of hot dogs and hamburgers sold in street food vendors as well as the microbiological quality of the hands of food handlers. Ten samples of hot dog, 10 of hamburgers and 9 samples of the hands of food handlers were collected in ten street vended foods in Porto region (8 from Porto and 2 from Vila Nova de Gaia). The microbiological quality analysis of food followed the international standard methods for counting aerobic mesophilic, *Enterobacteriaceae*, coliform, *Escherichia coli*, coagulase-positive *Staphylococcus* and detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. The hygienic condition of the hands of the food handlers were analysed for aerobic mesophilic counts and counts/detection of *Enterobacteriaceae*, coliform, *E. coli*, coagulase-positive *Staphylococcus* and detection of *Salmonella*. The *E. coli* isolates were also identified by PCR assays for the 16S rDNA and phylogenetic groups. All the food samples were “unsatisfactory” for at least two of the parameters (*Enterobacteriaceae* and coliformes). Although *Salmonella* and coagulase-positive *Staphylococcus* were absent, *L. monocytogenes* was detected in 4 products (20%) obtained from 3 mobile units. *E.coli* from phylogenetic groups A0, A1 and B1 were detected in 13 (65%) products of both types, with 5 (25%), from 5 units (50%), presenting “unsatisfactory” levels. The food handler’s hygienic condition was “unsatisfactory” for the presence of *Enterobacteriaceae* and coliforms in all the samples analyzed and for *E. coli* in 2 out of 9 (22%) and coagulase-positive *Staphylococcus* in 4 out of 9 food handlers (44%). This study shows that ready-to-eat foods available for consumption in 10 mobile units of Porto region had a poor microbiological quality as well as the hygienic condition of food handlers. Those findings suggest the need to regulate the activity of street vending food, including training of food handlers in food hygiene and safety and improving infrastructures, to prevent the transmission of potential pathogenic bacteria to humans through the food chain.

Keywords: food service mobile units, street vended food, food safety, hot dog, hamburger, food handlers.

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1	Evolução do setor alimentar	1
1.1.1.	Venda ambulante de alimentos.....	2
1.2.	Regulamentação em higiene e segurança dos alimentos.....	3
1.2.1.	Regulamentação do setor de venda ambulante.....	5
1.3.	Segurança alimentar e venda ambulante.....	9
2.	Objectivos.....	19
3.	Material e Métodos.....	20
3.1	Plano de amostragem.....	20
3.2.	Colheita das amostras.....	21
3.3.	Preparação das amostras.....	21
3.4.	Parâmetros microbiológicos.....	22
3.4.1.	Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos.....	22
3.4.2.	Contagem e pesquisa de <i>Enterobacteriaceae</i>	23
3.4.3.	Contagem e pesquisa de coliformes.....	23
3.4.4.	Contagem e pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	24
3.4.4.1.	Caracterização dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	25
3.4.5.	Contagem e pesquisa de <i>Staphylococcus coagulase positivo</i>	27
3.4.6.	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
3.4.7.	Pesquisa de <i>Salmonella</i>	28
3.4.7.1.	Método convencional.....	28
3.4.7.2.	Método molecular.....	28
3.5.	Critérios microbiológicos.....	29

4.	Resultados e Discussão.....	30
4.1.	Indicadores de alteração.....	32
4.2.	Bioindicadores/Indicadores de higiene.....	33
4.3.	Microrganismos patogénicos.....	38
4.4.	Avaliação global das roulettes.....	44
5.	Conclusões.....	46
6.	Referências Bibliográficas.....	47
	Anexos.....	52

Índice de Figuras

- Figura 1:** Prevalência e alteração de concentração bacteriana num cenário de contaminação cruzada, incluindo o impacto da transferência de bactérias, sobrevivência bacteriana e comportamento dos manipuladores, bem como os processos de crescimento e inativação. Os símbolos +/- indicam um aumento ou a redução do efeito, respetivamente, sobre a prevalência e concentração microbiana.....11
- Figura 2:** Mecanismos de contaminação física e microbiológica em venda-ambulante e suas vias. As setas indicam vias de contaminação. Os triângulos pretos (▲) indicam os principais fatores de contaminação e os triângulos brancos (△) indicam os fatores de contaminação menores13
- Figura 3:** Frequência de amostras classificadas em satisfatórias, aceitáveis, não satisfatórias e inaceitáveis, por parâmetro microbiológico e tipo de amostra.....31
- Figura 4:** Frequência de amostras classificadas em satisfatórias, aceitáveis, e não satisfatórias para o parâmetro microrganismos aeróbios mesófilos por tipo de amostra.....33
- Figura 5:** Frequência de amostras classificadas em satisfatórias, aceitáveis, e não satisfatórias para os parâmetros *Enterobacteriaceae* (esquerda) e coliformes (direita) por tipo de amostra.....34
- Figura 6:** Frequência de amostras classificadas em satisfatórias, aceitáveis e não satisfatórias para o parâmetro *Escherichia coli* por tipo de amostra.....37
- Figura 7:** Grupos filogenéticos dos isolados de *Escherichia coli* (n=31) por tipo de amostra.....38
- Figura 8:** Frequência de amostras de alimentos classificadas em satisfatórias, aceitáveis, não satisfatórias e inaceitáveis para os parâmetros *Staphylococcus coagulase positivo*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*.....39
- Figura 9:** Frequência de amostras de manipuladores classificadas em satisfatórias e não satisfatórias para os parâmetros *Staphylococcus coagulase positivo* e *Salmonella*.....41

Índice de Tabelas

Tabela 1: Comparações das disposições regulamentares aplicáveis ao setor da venda ambulante de alimentos.....8

Tabela 2: Perigos e risco microbiológico envolvido nas unidades de venda ambulante.....14

Lista de Abreviaturas

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

DGS - Direção Geral da Saúde

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EM - Estados Membros

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FCNAUP - Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

OMS/WHO - Organização Mundial da Saúde / *World Health Organization*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

UE - União Europeia

1-Introdução

1.1- Evolução do setor alimentar

O setor alimentar, nomeadamente a restauração pública e coletiva, têm um papel fulcral na economia de cada país, representando o maior setor industrial de Portugal e dos diversos países da Europa ⁽¹⁾. Na União Europeia, segundo a Federação Europeia de Restauração Coletiva (FERCO), a extensão dos negócios da restauração coletiva equivale a 20,6 mil milhões de euros ⁽²⁾. Em Portugal, de 2000 a 2005, ocorreu um aumento médio anual de 9,3% na faturação, correspondendo a 436 milhões de euros, tendo ocorrido no mesmo período um acréscimo de 136 milhões de refeições comparativamente com os 99 milhões servidos em 2000 ⁽²⁾.

Na Europa, uma em cada quatro refeições são servidas por estabelecimentos de restauração, englobando cerca de 67 milhões de consumidores diariamente ⁽³⁾. Este mercado das refeições prontas, focado principalmente para um público com uma vida profissional ativa, mas também para quem procura episódios de lazer, está atualmente em forte crescimento ⁽⁴⁾. A evolução e desenvolvimento do ramo da restauração deve-se a uma mudança dos hábitos e costumes das populações, para além de outros fatores sociais e económicos ⁽⁵⁾. O consumidor atual caracteriza-se por ser cada vez mais exigente e crítico em relação à sua alimentação, passando a consumir maiores quantidades de alimentos fora de casa, onde procura variedade, conveniência e lazer, mas ao mesmo tempo espera que estes sejam seguros para a saúde ^(4, 6). Este aumento do consumo alimentar em estabelecimentos de restauração coletiva/pública deve-se a diversos fatores, sendo de salientar o crescimento da população residente em meios urbanos, a alteração do estilo de vida, onde com a entrada da mulher no mundo do trabalho diminuiu a disponibilidade para a preparação de refeições em família, e o aumento do poder de compra, potenciando assim o crescimento do setor ⁽⁵⁾.

A procura constante pelo setor alimentar, quer de restauração coletiva, quer da restauração pública, por si só bastante diversificado, requer uma preocupação

constante por parte das entidades competentes e fiscalizadoras, incluindo governos civis (em representação do estado) e câmaras municipais, que controlam a oferta alimentar e a qualidade das refeições disponibilizadas pelos estabelecimentos de restauração ^(7, 8). Entre as unidades de restauração pública, destacam-se as cadeias nacionais e internacionais de *fast-food* pelo seu sucesso junto do consumidor atual. Estas cadeias de *fast-food*, sendo uma área da restauração ágil acabam por levar a que os estabelecimentos mais tradicionais se adaptem e passem a servir o mesmo tipo de produtos alimentares, de modo a que estes se mantenham competitivos e com uma posição de destaque na área da alimentação ⁽⁴⁾. Um exemplo de estabelecimentos de restauração onde se verifica a venda deste tipo de alimentos são as unidades de venda ambulante, comumente identificadas como roulettes de cachorros e hambúrgueres.

1.1.1 Venda ambulante de alimentos

A venda de alimentos e de refeições na rua, também designada por venda ambulante, conheceu um crescimento exponencial em todo o mundo, mais particularmente nos países em vias de desenvolvimento. Nestes países tem ocorrido um crescimento exponencial das unidades de venda ambulante de alimentos nos centros urbanos, fruto do êxodo rural das populações associado às elevadas taxas de desemprego ⁽⁹⁾. Nos países industrializados, incluindo a Europa ocidental, verificou-se que o estilo de vida frenético e acelerado das populações conduziu também a uma procura crescente de refeições fora de casa mais rápidas e mais económicas ⁽¹⁰⁾. A alimentação em unidades móveis de restauração enquadra-se assim no quotidiano das populações das grandes cidades dos países industrializados ⁽¹¹⁾. Este tipo de alimentação é muito apreciado pelos consumidores devido ao baixo preço, disponibilidade de alimentos e suas características organolépticas, sendo sinónimo de refeições rápidas e de fácil acesso ⁽¹²⁾. Como consequência das mudanças nos hábitos alimentares das populações e de diversos fatores sociais e económicos, milhões de consumidores em todo o mundo procuram atualmente este tipo de unidades móveis de alimentação ^(10, 13).

O consumo de alimentos e refeições vendidos na rua tem aumentado significativamente, conquistando uma grande representatividade no setor alimentar ⁽⁹⁾. Dados referentes ao ano de 2005 estimavam que 25% da população mundial possuía o hábito de se alimentar no comércio ambulante ⁽¹¹⁾. Adicionalmente, diversos fatores políticos e sócio-económicos contribuíram para que nas últimas décadas houvesse uma proliferação de vendedores ambulantes também nas grandes cidades dos países industrializados ^(9, 11, 14). A venda ambulante de refeições providencia emprego e rendimento económico, sem necessidade de recurso a elevado investimento ^(9, 12). Por este motivo, a venda ambulante de alimentos permite ultrapassar de um modo rápido e direto o problema do desemprego, que se tem agravado não só nos países em vias de desenvolvimento, como também no mundo ocidental ^(9, 12). Atualmente, a venda ambulante de alimentos é um setor com um alto grau de empregabilidade, para o que tem contribuído o facto de não requerer formação académica específica, atraindo trabalhadores pouco qualificados e induzindo a que qualquer pessoa possa iniciar este tipo de atividade ^(9, 15, 16). Assim, a venda ambulante de alimentos tem contribuído significativamente para a redução da pobreza, pois está associada à criação de oportunidades de emprego ⁽⁹⁾. A título de exemplo, estima-se que no ano de 2001, na África do Sul, tenham sido geradas 911.000 oportunidades de emprego no setor da venda ambulante ⁽⁹⁾. No entanto, apesar de satisfazer as necessidades alimentares de parte da população e de ser uma alternativa para o sustento de milhões de pessoas, representa um importante fator de risco para a saúde pública, suscitando múltiplas preocupações ao nível da higiene e da segurança alimentar ^(9, 16).

1.2- Regulamentação em higiene e segurança dos alimentos

A garantia do fornecimento de produtos seguros e de qualidade é uma obrigação das unidades de restauração que fornecem o serviço e um direito do consumidor ^(11, 17). A procura de um elevado nível de proteção da vida e da saúde humanas é um dos objetivos fundamentais da legislação alimentar, tal como se encontra estabelecido no Regulamento (CE) n.º 178/2002 ⁽¹⁸⁾. Este Regulamento

estabelece igualmente os princípios e definições comuns para a legislação alimentar nacional e comunitária, incluindo o objetivo de alcançar a livre circulação dos alimentos na União Europeia (EU) ⁽¹⁸⁾. Assim, todos os operadores do setor alimentar devem assegurar, em todas as fases de produção, transformação e distribuição nas empresas do seu controlo, que os géneros alimentícios preenchem os requisitos da legislação alimentar e devem verificar o cumprimento desses requisitos ⁽¹⁸⁾. O Regulamento (CE) 852/2004 ⁽¹⁹⁾ relativo à higiene dos géneros alimentícios, aplicado diretamente em todos os Estados Membros da UE determinou que a partir de Janeiro de 2006 todas as atividades relacionadas com o ramo alimentar implementassem um Sistema de Segurança Alimentar, com exceção das atividades de produção primária. Este regulamento determinou ainda que no Sistema de Segurança Alimentar a implementar fossem aplicados os princípios do HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Points* (Análise dos perigos e controlo dos pontos críticos) ⁽¹⁹⁾. Segundo o nº1 do artigo 5º do Regulamento (CE) nº 852/2004 ⁽¹⁹⁾, todos os operadores das empresas do setor alimentar, devem criar, aplicar e manter um processo ou processos permanentes baseados nos princípios HACCP. Os requisitos do sistema HACCP deverão tomar em consideração os princípios constantes do *Codex Alimentarius*, no entanto, podem ainda os operadores das empresas do setor alimentar utilizar voluntariamente códigos de boas práticas para aplicação dos princípios HACCP ⁽¹⁹⁾. O *Codex Alimentarius* fornece um conjunto de princípios sólidos, reconhecidos internacionalmente, que permitem garantir a higiene e segurança dos alimentos e que devem ser usados em conjunto com outros códigos, se for o caso, ou orientações, como os critérios microbiológicos ⁽¹⁷⁾. O HACCP é um sistema que identifica, avalia e controla os perigos significativos para a saúde, uma vez que os seus objetivos são garantir a segurança dos alimentos através da identificação dos perigos associados ao seu manuseamento e das medidas adequadas ao seu controlo. Como tal, deverá ser encarado como uma ferramenta de análise e prevenção de perigos associados ao processamento alimentar, aplicado ao longo de toda a cadeia alimentar, e não apenas do produto final ⁽²⁰⁾. Este tipo de sistema deve apresentar requisitos que tenham flexibilidade suficiente para serem aplicáveis em todas as situações, incluindo pequenas empresa, considerando o ponto 15 do Regulamento (CE) nº 852/2004, de 29 de Abril ⁽¹⁹⁾. Deve também constituir um sistema de gestão de perigos pró-activo, que

pretende manter sob controlo a contaminação dos alimentos com microrganismos, substâncias químicas ou contaminantes físicos de maneira a que se produzam alimentos seguros ⁽²¹⁾.

Os programas de segurança alimentar podem ser subdivididos em Pré-requisitos (Estruturas e Equipamentos, Plano de Higienização, Controlo de Pragas, Abastecimentos de Água, Recolha de Resíduos, Material para contacto com os alimentos, Higiene Pessoal, Formação) e Análise de Perigos e Controlo dos Pontos Críticos (HACCP), tal como previsto no Regulamento (CE) nº 852/2004 ⁽¹⁹⁾, sendo punida a sua não aplicação pela alínea a) do nº1 do Artigo 6º do Decreto-Lei nº113/2006 ⁽²²⁾. É de salientar que os pré-requisitos controlam os perigos associados ao meio envolvente ao processo de produção do género alimentício, enquanto que o sistema HACCP controla perigos associados diretamente ao processo de produção ⁽²²⁾.

1.2.1 Regulamentação do setor da venda ambulante

Os procedimentos baseados nos princípios HACCP constituem um instrumento que permite às empresas do setor da alimentação atingir um nível mais elevado de segurança alimentar, tal como descrito no Regulamento (CE) nº 852/2004 para todos os Estados Membros da UE ⁽¹⁹⁾. No entanto, o mesmo Regulamento indica que os requisitos do sistema HACCP deverão ter a flexibilidade suficiente para serem aplicáveis em todas as situações, incluindo em pequenas empresas, onde se podem incluir as unidades de venda ambulante. A flexibilidade da aplicação do sistema HACCP será aplicável aos operadores do setor alimentar que depois de terem identificado os perigos associados a cada etapa do processo e terem tentado identificar os pontos de controlo críticos, considerem não ser possível determinar os mesmos e que com aplicação de medidas preventivas, ou seja, boas práticas de higiene, asseguram a segurança dos alimentos ⁽¹⁹⁾. De acordo com o documento de orientação sobre a aplicação de procedimentos baseados nos princípios HACCP e sobre a simplificação da aplicação dos princípios HACCP em determinadas empresas do setor alimentar, nomeadamente nas empresas onde não há preparação, produção ou

transformação de alimentos, pode parecer que todos os perigos podem ser controlados através da aplicação dos requisitos pré-determinados ⁽²¹⁾. Nestes casos, pode considerar-se que a primeira fase do procedimento HACCP (a análise dos perigos) foi executada e que já não há necessidade de desenvolver e aplicar os demais princípios HACCP ⁽²¹⁾. Existem algumas empresas que podem ser elegíveis para simplificação do sistema HACCP, incluindo os veículos para venda ambulante ⁽²¹⁾.

Em Portugal, o regime jurídico da venda ambulante está consagrado no DL 122/79, de 08 de maio ⁽²³⁾, documento legislativo base que disciplina esta atividade. Tal diploma sofreu várias alterações, introduzidas pela Portaria n.º 1059/81, de 15 de dezembro (que alterou o seu Anexo) e pelos Decretos-Lei n.º 282/85 de 22 de julho, n.º 283/86 de 5 de setembro, n.º 399/91 de 16 de outubro, n.º 252/93 de 14 de julho e 9/2002 de 24 de janeiro. Adicionalmente, os Municípios Portugueses exercem um amplo poder de controlo sobre a atividade de venda ambulante de alimentos, porque são os responsáveis pela emissão de licenças, sendo o licenciamento efetuado em função de aspetos hígio-sanitários, estéticos e de comodidade para o público. Além disso, compete às Câmaras Municipais emitir e renovar o cartão para o exercício da venda ambulante, competência que poderá igualmente funcionar como ferramenta de controlo. Por último, os municípios dispõem ainda de mecanismos de fiscalização tendentes a averiguar o cumprimento das normas e exigências aplicáveis ao setor. Por exemplo, os Municípios do Porto e de Vila Nova de Gaia emitiram, respetivamente, o Código Regulamentar do Município do Porto ⁽²⁴⁾ e o Regulamento de Vendedores Ambulantes do Município de Vila Nova de Gaia ⁽²⁵⁾, documentos de aplicação vinculativa bastante exaustivos e detalhados nas regras aplicáveis à venda ambulante. Com efeito, ambos os regulamentos camarários preveem a necessidade da emissão de licença prévia, da criação de um registo de vendedores ambulantes e ainda da atribuição de um cartão de vendedor ambulante. Complementarmente, determinam quais os produtos de venda absolutamente proibida e ainda quais as regras hígio-sanitárias aplicáveis aos locais de venda. Por último, ambos os regulamentos consagram um regime sancionatório, prevendo a aplicação de coimas em caso de incumprimento das regras aí determinadas. Em suma, os regulamentos camarários transpõem para a

esfera municipal aquilo que está previsto na legislação nacional, em concreto, no DL n.º 122/79, de 08 de maio ⁽²³⁾.

A nível comunitário, aplica-se o Regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004 ⁽¹⁹⁾, relativo à higiene dos géneros alimentícios, sendo que o Capítulo III é dedicado aos requisitos aplicáveis à venda ambulante, consagrando, entre outras, as regras relativas aos locais de venda, ao abastecimento de água, à eliminação de resíduos, à higiene pessoal, ao tratamento térmico dos alimentos e à formação e instrução dos vendedores ambulantes. Ainda nesta matéria, há que referir que o DL n.º113/2006, de 12 de junho ⁽²⁶⁾, que aprova o regime sancionatório do Regulamento (CE) nº 852/2004 ⁽¹⁹⁾, garantindo a execução e cumprimento, no ordenamento jurídico nacional, das obrigações decorrentes do referido regulamento comunitário. Este diploma atribui competências fiscalizadoras a vários organismos e consagra também um regime sancionatório que prevê a aplicação de coimas e outras sanções acessórias em caso de incumprimento ⁽²⁶⁾.

Da análise comparada entre as disposições regulamentares aplicáveis ao setor da venda ambulante de alimentos, verifica-se que todos os diplomas nacionais exigem a emissão de licença e de cartão de vendedor, que se apresentam como pressupostos fundamentais para o exercício desta atividade **(Tabela 1)**. Relativamente às exigências higio-sanitárias, aplicáveis aos locais de venda, aos utensílios, ao transporte e embalagem dos alimentos e ainda à higiene pessoal dos vendedores ambulantes, verifica-se que os Regulamentos das Câmaras Municipais, incluindo o da CM do Porto ⁽²⁴⁾ e o da CM de Vila Nova de Gaia ⁽²⁵⁾, são bastante descritivos e completos, vertendo, de forma quase integral, os requisitos previstos na legislação comunitária ⁽¹⁹⁾ e no DL 122/79 ⁽²³⁾.

Tabela 1: Comparações das disposições regulamentares aplicáveis ao setor da venda ambulante de alimentos

Assunto	Regulamento (CE) N.º 852/2004 ⁽¹⁹⁾	Decreto - Lei 122/79 ⁽²³⁾	Regulamento CM Porto ⁽²⁴⁾	Regulamento CM Gaia ⁽²⁵⁾
Licença	Não	Sim (artigo 18.º, n.º 3)	Sim (artigo E-5/3.º e E-5/6.º)	Sim (artigo 4.º, n.º 1)
Cartão de vendedor ambulante	Não	Sim (artigo 12.º, 18.º e 19.º)	Sim (artigo E-5/6.º)	Sim (artigo 4.º, n.º 1)
Registo de vendedores	Não	Sim (artigo 19.º)	Sim (artigo E-5/7.º)	Sim (artigo 5.º)
Produtos Interditos à venda ambulante	Não	Sim (artigo 7.º)	Sim (artigo E-5/13.º)	Sim (artigo 18.º)
Deveres e práticas proibidas	Não	Sim (artigo 4.º)	Sim (artigo E-5/16.º e E-5/17.º)	Sim (artigo 19.º e 21.º)
Requisitos higio sanitários (locais de venda, utensílios, transporte, embalagem e higiene pessoal)	Sim	Sim (artigos 3.º, 5.º, 6.º e 8.º)	Sim (artigos E-5/14.º, E-5/19.º, E-5/20.º, E-5/25.º a E-5/27.º)	Sim (Artigos 14.º a 16.º e 21.º)
Fiscalização	Não	Sim (artigo 20.º)	Sim (artigo H/2.º)	Sim (artigo 23.º)

Por último, sublinha-se que todos os diplomas nacionais consagram um sistema de fiscalização, prevendo a aplicação de coimas e sanções acessórias, em sede de responsabilidade contraordenacional. Especial destaque merece também a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), organismo administrativo nacional especializado na fiscalização e controlo da segurança alimentar. A ASAE também funciona como órgão de polícia criminal, pelo que tem competência para velar pelo cumprimento dos dispositivos legais em vigor e para

aplicar coimas e outras sanções. Contudo, a ASAE não tem competências de regulamentação, validação ou emissão de quaisquer pareceres técnicos vinculativos. Em suma, a criação de regimes sancionatórios de natureza contraordenacional e a atribuição de competências de fiscalização e controlo a entidades e organismos são formas de garantir o cumprimento das disposições legais relativas à higiene e segurança da venda ambulante de alimentos.

1.3 Segurança alimentar e venda ambulante

Vários fatores podem contribuir para a desvalorização do alimento, sendo de destacar a sua contaminação. A contaminação pode ocorrer sob ação de agentes de diversa natureza, tais como biológicos, químicos e/ou físicos, sendo possível que ocorra ao longo de toda a cadeia alimentar ⁽¹¹⁾. Uma grande variedade de doenças pode ser transmitida ao Homem através dos alimentos e/ou água ⁽²⁷⁾. Assim sendo, os alimentos podem servir de veículo para a transferência de microrganismos patogénicos para o consumidor, podendo permitir o seu crescimento até dose infecciosa (“Infeção alimentar”) ou permitir o seu crescimento e produção de toxinas que afetam o consumidor (“Intoxicação alimentar”) ⁽²⁷⁾. Após a ingestão do alimento contaminado podem ocorrer diversos tipos de sintomas no indivíduo afetado que podem ir desde dores de cabeça e sintomas gastro-intestinais até doença invasiva e mesmo morte do indivíduo ⁽¹¹⁾.

A prevenção das doenças de origem alimentar requer ações ao longo de toda a cadeia produtiva, desde os produtores até aos consumidores finais dos alimentos, podendo estes também ter um papel ativo ^(11, 28). Para tal, é necessário haver uma perceção dos modos de contaminação e multiplicação dos microrganismos nos alimentos, de maneira a garantir a sua segurança e assim prevenir danos para a saúde dos consumidores ^(11, 28). Todos os anos ocorrem muitos casos de intoxicações e infeções alimentares, apesar da maior parte não ser registada pelos organismos de vigilância ^(29, 30). As principais causas registadas são manipulações incorretas, falhas na conservação e confeção dos alimentos, falta de higiene, incumprimento de boas práticas, entre outras ⁽⁵⁾. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças de

origem alimentar são 300 a 350 vezes mais frequentes do que é indicado pelos casos declarados, afetando anualmente uma em cada três pessoas em todo o mundo ⁽³¹⁾. A OMS apresenta valores baseados em estimativas, pois a maioria dos países, inclusive os países desenvolvidos (ex. países da União Europeia), não dispõem de sistema de registo de dados e vigilância ⁽³¹⁾. Esta falta de informação epidemiológica, quer sobre as vias comuns de contaminação, quer sobre as fontes de contaminação, deve-se principalmente a dois fatores importantes: dificuldade para investigar a origem da contaminação e a perda de informação crucial para o seu estudo ⁽³²⁾. No entanto, a disponibilização de dados, como seja o registo das toxinfecções alimentares mais comuns, possibilita a elaboração de estudos que permitem uma correta avaliação dos riscos que os microrganismos representam e, assim, a implementação de medidas de prevenção eficazes ⁽³¹⁾.

De todas as formas de contaminação (biológicas, químicas e físicas) referidas anteriormente, as que se manifestam através da ação de agentes biológicos são as que merecem maior preocupação devido ao seu impacto e maior transtorno para o Homem ⁽³¹⁾. Este tipo de contaminação pode afetar a qualidade dos alimentos (ex. deterioração) e/ou a saúde humana durante toda a cadeia alimentar / manipulação de alimentos, desde o produtor até o consumidor final ⁽²⁷⁾. Estima-se que as doenças provocadas por microrganismos equivalem a 90% das doenças transmitidas por alimentos ⁽³¹⁾.

A transferência bacteriana é um ponto fundamental na transmissão de doenças de origem alimentar ⁽³²⁾. No estudo efetuado por Pérez-Rodríguez *et al.* ⁽³²⁾ estão indicados os processos mais comuns de transferência de bactérias para os alimentos, tendo os autores concluído que os fatores mais associados à transferência bacteriana são os altos níveis de humidade, o tempo de contacto e a pressão exercida ⁽³²⁾. Por exemplo, a maioria das bactérias em ambientes de stress, como são as superfícies, não resistem e acabam por morrer por desidratação e falta de nutrientes, sendo que a velocidade de tais acontecimentos é dependente do tipo de bactéria e da natureza do nicho ambiental ⁽³²⁾. Assim sendo, é possível determinar a transferência bacteriana para os alimentos, pois a capacidade de sobrevivência dos microrganismos determina se ocorre transferência ou não de bactérias e o número de bactérias transferidas (**Figura 1**).

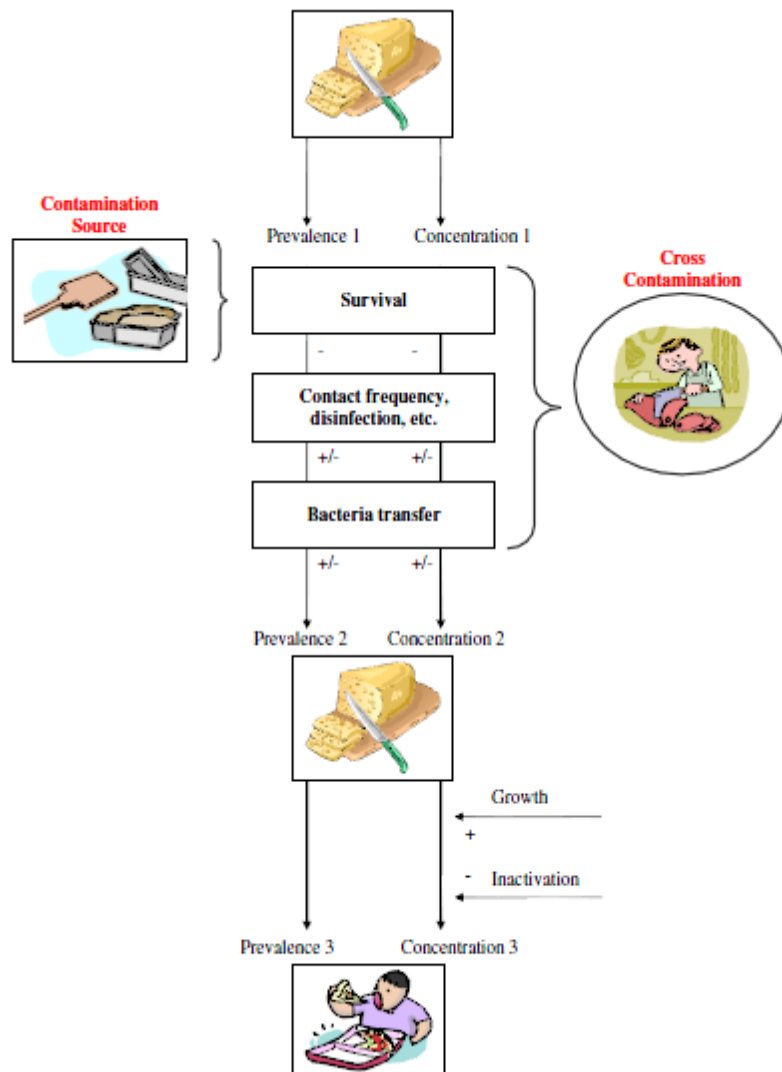


Figura 1: Prevalência e alteração de concentração bacteriana num cenário de contaminação cruzada, incluindo o impacto da transferência de bactérias, sobrevivência bacteriana e comportamento dos manipuladores, bem como os processos de crescimento e inativação. Os símbolos +/- indicam um aumento ou a redução do efeito, respetivamente, sobre a prevalência e concentração microbiana ⁽³²⁾.

A transferência, direta ou indireta de microrganismos de um ponto contaminado para um não contaminado, descreve o processo de contaminação cruzada de uma maneira mais generalizada ⁽³²⁾. Diversos autores referem a contaminação cruzada como sendo uma das vias de contaminação mais frequentemente associada com as doenças de origem alimentar ⁽³²⁾. De um modo geral, a transferência de microrganismos para os alimentos engloba também as contaminações por falta de higiene dos manipuladores, recontaminações, contaminações através de equipamentos e utensílios, entre outros ⁽³²⁾. Assim,

conhecer e compreender o processo de transferência das bactérias para os alimentos pode ser útil para dificultar ou mesmo evitar essas ocorrências. Por exemplo, sabe-se que superfícies e utensílios porosos (ex. roupas, aventais e esponjas) apresentam taxas de transferência menores quando comparadas com superfícies não porosas (ex. aço inoxidável, botões, entre outras) ⁽³²⁾. No entanto, esta situação seria revertida caso fosse verificada a presença de água acumulada nas roupas e esponjas, por exemplo, pelo aumento do tempo de sobrevivência do microrganismo. Por outro lado, a existência de fissuras ou corrosão facilita a acumulação de bioincrustação e a manutenção de microrganismos, influenciando negativamente a disponibilidade de bactérias para transferência ⁽³²⁾. Consequentemente, os microrganismos ficam mais protegidos do stress ambiental, prolongando assim o seu tempo de transferência. No entanto, a presença de humidade revertia a situação de acumulação das bactérias nas fissuras e depressões, tornando-as menos aderentes a essas superfícies e elevando a sua possibilidade de transferência ⁽³²⁾. Assim, a realização de métodos adequados de limpeza e desinfecção funciona como prevenção da transferência de bactérias para os alimentos ⁽³²⁾.

O setor de venda ambulante, sustento de milhões de pessoas, acarreta inúmeras preocupações ao nível da higiene e segurança alimentar pois sendo uma via de satisfação das necessidades alimentares duma parte da população, torna-se um fator importante de risco para a saúde pública ^(9, 16). Tendo em conta o crescimento exponencial do setor alimentar de venda ambulante, a OMS efetuou um estudo em mais de 100 países focado em "alimentos vendidos na rua", de modo a avaliar a situação de venda e consumo nas unidades que os disponibilizam ⁽³³⁾. Os resultados demonstraram que na maioria dos países as causas de contaminação englobaram a utilização de alimentos crus contaminados, manipuladores infetados e/ou equipamentos em estado higiénico inadequado ^(33, 34). Para além disso, apontou as infra-estruturas locais, o tempo e temperatura de confeção como as variáveis que mais contribuíram para as doenças de origem alimentar nesses estabelecimentos (**Figura 2**) ^(33, 34).

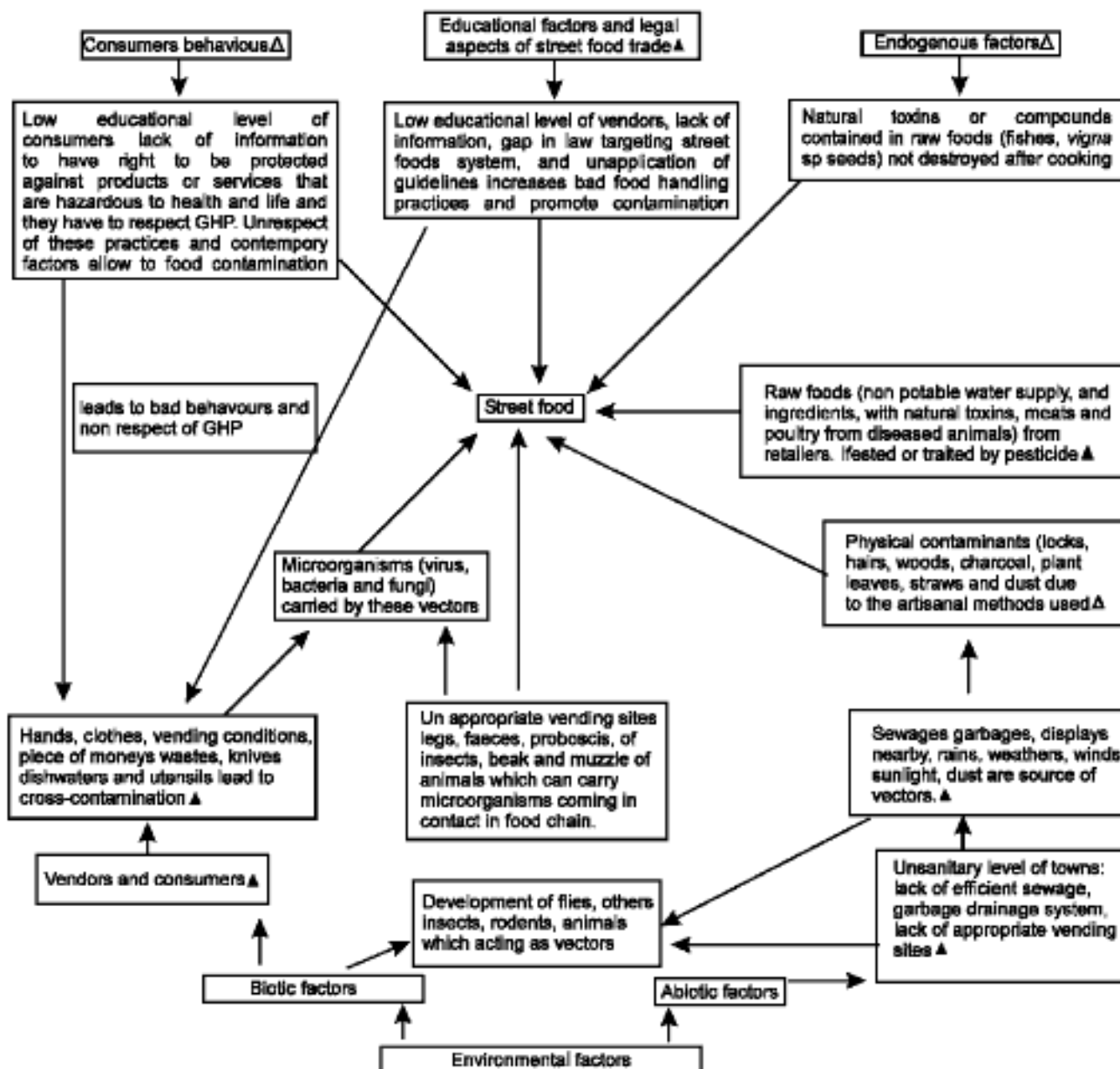


Figura 2: Mecanismos de contaminação física e microbiológica em venda ambulante e suas vias. As setas indicam vias diretas de contaminação. Os triângulos pretos (▲) indicam os principais fatores de contaminação e os triângulos brancos (△) os fatores de contaminação menores⁽³⁴⁾.

De facto, a possibilidade de contaminação dos alimentos disponibilizados nas unidades de venda ambulante e as consequentes doenças de origem alimentar têm sido destacadas por vários autores^(9, 16). Esta situação deve-se fundamentalmente à ausência de conhecimentos básicos para a manipulação correta e segura dos alimentos por parte dos trabalhadores, mas também à falta de infra-estruturas adequadas^(11, 13).

A partir de uma abordagem da gestão do risco, a identificação e eliminação de certas tarefas ou atividades que envolvam fatores que afetam a transferência de microrganismos para os alimentos (ex. humidade, tempo de contacto, pressão, etc) pode vir a ser útil para evitar contaminação dos alimentos ⁽³²⁾. Diversos fatores, desde a contaminação inicial de alimentos crus com bactérias patogénicas até uma contaminação posterior por parte dos vendedores durante a preparação dos alimentos, devem ser considerados para a análise dos riscos em alimentos vendidos na rua ou seja de venda ambulante **(Tabela 2)** ⁽³⁵⁾.

Tabela 2: Perigos e risco microbiológico envolvido nas unidades de venda ambulante ⁽³⁵⁾.

S.No.	Source	Hazard	Risk involved
1	Vendor location	Improper food handling	Transfer of pathogens like <i>Salmonella</i> and <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> from human body and environment into foods
2	Raw materials	Improper waste disposal	Transmission of enteric pathogens like <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> and <i>E. coli</i> via vectors
		Water	Passage of pathogens like <i>E. coli</i> , fecal streptococci, <i>Salmonella</i> and <i>Vibrio cholerae</i>
3	Utensils and equipments	Vegetables and spices	Introduction sporeformers like Bacilli and Clostridium and pathogens like <i>L. monocytogenes</i> , <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , etc.
		Chemical contaminants	Leaching of chemical leading to poisoning
4	Storage and reheating	Microbial contaminants	Cross contamination of food with <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> and <i>Shigella</i> due to contaminated water, dish cloth, handler
		Improper storage temperature and reheating of food	Likelihood of heat stable toxins produced by pathogens like <i>C. perfringens</i> and <i>B. cereus</i>
5	Personal hygiene of vendors	Biological hazards	Introduction of <i>Staphylococcus</i> , <i>Salmonella</i> and <i>Shigella</i> via carriers

Os manipuladores de alimentos desempenham um papel fulcral ao nível da segurança alimentar ao longo de toda a cadeia de produção, processamento, armazenamento e preparação de alimentos ⁽³³⁾. Deste modo, a falta de condições higio-sanitárias durante estas etapas podem permitir o contacto de microrganismos com os alimentos, podendo estes sobreviver e multiplicar-se em quantidade suficiente para causar doenças ao consumidor ⁽³⁵⁾. A manipulação de alimentos de venda ambulante por parte do manipulador sob condições não higio-sanitárias tem sido evidenciada como sendo a fonte de contaminação mais comum neste tipo de unidades de alimentação ⁽³⁵⁾. Os vendedores podem ser portadores de diversos agentes patogénicos como por exemplo *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* e *Staphylococcus aureus* e, eventualmente, transmitirem estes microrganismos para os consumidores através da via alimentar. As mãos dos manipuladores de alimentos são consideradas a fonte de maior importância

na transferência de microrganismos a partir de fezes, nariz e pele para os alimentos. De referir ainda que algumas bactérias (ex. *Salmonella*, *Campylobacter* e *E. coli*) podem sobreviver na ponta dos dedos e de outras superfícies por períodos longos de tempo e, em alguns casos, mesmo após a lavagem das mãos ⁽³⁵⁾. Vários estudos evidenciam que este tipo de unidades de restauração móveis emprega habitualmente funcionários de baixas classes sociais e, muitas vezes, sem conhecimentos básicos de higiene e de técnicas corretas de manipulação de alimentos ^(13, 15). Por exemplo, um estudo efetuado na Turquia, em 2002, indicou uma correlação positiva entre experiência profissional e higiene das mãos, ou seja os manipuladores com mais experiência apresentavam melhores níveis de higiene das mãos ⁽¹⁵⁾. No entanto, estes autores também concluíram que independentemente do nível de educação dos manipuladores estes devem ser bem treinados no que diz respeito à manipulação dos alimentos, incluindo higiene adequada das mãos, de modo a produzirem alimentos seguros ⁽¹⁵⁾. Também Choudhury *et al* ⁽³⁶⁾, verificaram que após a formação dos manipuladores em higiene e segurança alimentar, estes revelaram um aumento do nível de conhecimento e uma melhora na avaliação do desempenho global em termos da aplicação dos conhecimentos adquiridos. Desta forma, a formação dos manipuladores de alimentos é crucial para a melhoria dos conhecimentos e do desempenho relativamente à higiene e segurança alimentar. De facto, a higiene das mãos, nomeadamente dos manipuladores, é um elemento chave para boas práticas de higiene em toda a cadeia alimentar, incluindo nas unidades de venda ambulante e em casa ⁽³⁷⁾. Numerosos surtos de doenças de origem alimentar têm origem nas mãos contaminadas, sujas ou mal lavadas, dos manipuladores de alimentos ^(15, 37, 38). Por exemplo, Abreu *et al* ⁽³⁹⁾ concluíram no seu estudo, sobre análise microbiológica das mãos dos manipuladores, que a má higiene das mãos foi o principal motivo pelo qual várias amostras de alimentos se encontravam contaminadas com coliformes e *E. coli*, referindo ainda que nenhum deles lavava as mãos durante o trabalho. Num outro estudo realizado na Colômbia, verificou-se que mais de 30% dos manipuladores de alimentos analisados eram portadores de microrganismos patogénicos, incluindo *Salmonella Typhi*, *Salmonella Enteritidis* *Staphylococcus aureus* e *Shigella* ⁽³⁵⁾. Relativamente ao uso de luvas, é de notar um não há uma posição concensual em relação ao uso ou não deste tipo de adereço. Assim, alguns autores ^(15, 32) abordam este tema referindo um conjunto

de procedimentos a tomar para que se respeite a correta utilização de luvas, assim como atitudes reprováveis que tornam negativa e perigosa a sua utilização durante a elaboração de alimentos. Deste modo, Ayçiçek *et al* ⁽¹⁵⁾ sabendo que as mãos dos manipuladores são um potencial fator de risco para a saúde pública concluíram que é fundamental formação sobre procedimentos de lavagem das mãos corretos assim como de uso de luvas, sem deixar de prestar atenção ao nível de higiene na cozinha, pois esta também afeta a condição higiénica das mãos. Por exemplo, um dos fatores que potencia a contaminação dos alimentos através de luvas é a utilização destas molhadas, pois as bactérias podem ser mais facilmente transferidas através das luvas ^(15, 32). Além disso, práticas inadequadas associadas ao uso de luvas (ex. ausência de lavagem das mãos antes e depois do seu uso; falta de troca de luvas entre diferentes tarefas) é também apontado como um fator negativo para a sua utilização constante pelos manipuladores de alimentos ^(15, 32, 40).

Relativamente às infra-estruturas das unidades móveis de venda ambulante de alimentos verifica-se que estas são mais suscetíveis à contaminação microbiana, comparativamente com os estabelecimentos tradicionais de restauração, pois encontram-se ao ar livre e pouco resguardadas do ambiente circundante, sendo mais suscetíveis a contaminações provenientes do ar e poeiras ⁽³⁵⁾. Por outro lado, são locais onde as etapas de armazenamento, preparação, confeção e distribuição de alimentos são efetuadas num espaço demasiado limitado, o que proporciona a ocorrência de contaminações cruzadas e o cruzamento de tarefas/fluxos com muita facilidade ^(5, 29, 22). De facto, as condições sob as quais alguns vendedores ambulantes trabalham têm sido relatadas como sendo inadequadas para a preparação e venda de alimentos ⁽³⁵⁾. Estes manipuladores preparam as refeições em suas casas ou em estruturas localizadas em plena rua, feitas de madeira ou de outros materiais inadequados ⁽³⁵⁾. Adicionalmente, os locais de preparação nem sempre se encontram limpos, bem iluminados e afastados de possíveis fontes de contaminação ⁽³⁵⁾. Por exemplo, é comum as superfícies de preparação utilizadas por alguns manipuladores conterem restos de alimentos anteriormente preparados que podem promover a contaminação cruzada e os alimentos não se encontrarem tapados e por isso expostos a insetos (ex. moscas) e pó, podendo estes ser veículos de microrganismos patogénicos ⁽³⁵⁾. Em 70-90% dos casos, foi detetada

a presença de animais, insetos e resíduos líquidos nas áreas de preparação de alimentos das unidades de venda ambulante estudadas ⁽³⁵⁾.

Por outro lado, as unidades móveis de restauração concentram-se em áreas sobrelotadas, onde há um elevado número de potenciais clientes, como são por exemplo estações de comboio e autocarros, escolas, hospitais, praias, parques e discotecas ⁽⁹⁾. Alguns destes locais oferecem um acesso muito limitado a instalações sanitárias básicas, sendo que a contaminação dos alimentos vendidos em roulottes é frequentemente associada aos manipuladores e aos resíduos/lixo gerados pelo processamento dos alimentos, os quais são normalmente abandonados na proximidade dos demais locais de venda. O abandono de resíduos nas ruas e valetas próximas aos locais de venda são incentivados pela falta de depósitos de lixo e de instalações para a drenagem de líquidos e de águas residuais. Deste modo, estas áreas vão também funcionar como habitats para roedores, moscas e um meio propício para o desenvolvimento de microrganismos ⁽³⁵⁾. Num estudo realizado em África ⁽³⁵⁾ revelou que 85% dos vendedores de rua prepara os alimentos (ex. peixes, saladas de frutas, milho assado e batatas fritas) em condições inadequadas em termos de higiene, tendo sido detetado lixo e outros resíduos perto desses pontos de venda ⁽³⁵⁾.

Adicionalmente, a qualidade das matérias-primas utilizadas na preparação de alimentos de rua reveste-se de grande importância, pois caso já exista contaminação, esta pode persistir durante a preparação e/ou confeção ⁽³⁵⁾. Por exemplo, a carne e alguns vegetais (ex. hortícolas e especiarias) estão comumente contaminados com um grande número de bactérias, podendo também incluir microrganismos potencialmente patogénicos como *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, e *Listeria monocytogenes*, para além de bactérias esporuladas (ex. *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*) ⁽³⁵⁾. A água é também considerada uma matéria-prima fundamental em várias etapas realizadas nas unidades móveis de restauração. A utilização de água contaminada pode revelar-se um risco para a saúde pública quando é utilizada para lavagem de alimentos, equipamentos, utensílios e mãos e quando é mesmo incorporada nos alimentos como um ingrediente ou utilizada no seu processamento. Por exemplo, a água é um veículo conhecido para enteropatogénicos tais como *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter* ⁽³⁵⁾.

Outros pontos importantes a considerar nas unidades de venda ambulante são a existência de utensílios e equipamentos adequados para cozinhar e armazenar adequadamente os alimentos preparados. Por exemplo, a má qualidade do material dos utensílios (ex. tábuas de corte de madeira) juntamente com más práticas de manuseamento podem favorecer o crescimento dos microrganismos patogénicos e/ou produção de toxinas e conduzir à recontaminação dos alimentos já processados ⁽³⁵⁾. Além disso, a temperatura de armazenamento dos alimentos reveste-se de vital importância na medida em que influencia diretamente o crescimento microbiano. A preparação de alimentos muito antes do seu consumo, o armazenamento à temperatura ambiente, a refrigeração e reaquecimento inadequados e a confeção incompleta dos alimentos prontos-a-comer são os principais fatores que contribuem para surtos de doenças de origem alimentar ⁽³⁵⁾. Por exemplo, num estudo realizado na China, foram atribuídas as responsabilidades de 691 surtos de intoxicações alimentares e 49 mortes aos alimentos vendidos na rua ⁽³⁵⁾.

Assim, tendo em conta os aspetos abordados neste capítulo (manipuladores e infra-estruturas) e uma vez que não existem muitos estudos sobre a venda ambulante na Europa, e em particular em Portugal, ao contrário do que acontece em relação aos países em desenvolvimento, pretendeu-se com este estudo avaliar unidades deste setor da restauração relativamente à qualidade e segurança alimentar microbiológicas. A possibilidade de contaminação de alimentos, quer pelos manipuladores, quer pelas próprias condições em que são preparados neste tipo de unidades de restauração, justifica a importância de se conhecer a situação atual deste setor em crescimento nos países industrializados, incluindo em Portugal.

2- Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer vendidos em unidades móveis de restauração.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a qualidade e segurança microbiológica de hambúrgueres em pão e cachorros-quentes vendidos em unidades móveis de restauração (roulottes) do Grande Porto;
2. Avaliar o estado higiénico das mãos de manipuladores das unidades móveis de restauração;
3. Estudar a relação entre os isolados obtidos das diferentes amostras de alimentos e manipuladores, através da caracterização molecular dos isolados de *Escherichia coli*.

3- Material e métodos

3.1- Plano de amostragem

O plano de amostragem teve início com o levantamento e posterior seleção dos estabelecimentos móveis de restauração existentes na zona do Grande Porto. Para tal, foi realizada uma pesquisa nas Câmaras Municipais do Porto e de Gaia, de modo a aceder à informação disponível relativamente a estes estabelecimentos, incluindo o tipo de regime em que se encontram (licenciadas ou não licenciadas) e sua localização. Deste modo, foi possível averiguar que na cidade do Porto se encontram licenciadas, em regime de venda ambulante, oito roulottes e, em regime especial, admitidas no âmbito das autorizações de eventos, duas roulottes. Já em Vila Nova de Gaia, nenhuma das unidades dispersas pela região se encontra licenciada, não havendo dados disponíveis acerca das mesmas na respetiva Câmara Municipal. Dentro desta realidade, e para a realização do estudo, foram selecionadas, oito roulottes da cidade do Porto, licenciadas em regime de venda ambulante, e duas roulottes de Vila Nova de Gaia, em funcionamento permanente, mas não licenciadas.

Das unidades móveis foram selecionados para análise microbiológica dois tipos de alimentos prontos a comer, cachorro-quente e hambúrguer em pão, uma vez que são os alimentos habitualmente procurados pelos consumidores neste tipo de estabelecimentos comerciais. Foram também selecionados para análise microbiológica da higiene das mãos, os manipuladores de cada unidade móvel que se encontrassem em atividade de preparação dos alimentos referidos anteriormente.

As amostras de cada estabelecimento foram colhidas durante a noite de Domingo, nas semanas de 13 de janeiro a 10 de fevereiro de 2013, perfazendo um total de 10 cachorros-quentes, 10 hamburgueres em pão e 9 manipuladores, respeitando o prazo máximo de 24 horas até a sua análise. Todas as amostras de alimentos, eram constituídas em grande parte pelo mesmo tipo de ingredientes, tais como pão, fiambre, queijo, batata-frita palha, milho, 3 tipos de molhos (ketchup, mostarda e maionese), tomate, cogumelos, cenoura, alface, cebola frita

e salsicha ou hambúrguer. Algumas amostras continham ainda a presença de ovo cozido, ervilhas ou couve-roxa. Estas unidades de restauração foram previamente informadas do trabalho em questão e do anonimato quanto à identidade dos requeridos, tendo assim, a grande maioria colaborado com o projeto.

3.2- Colheita das amostras

Para a colheita das amostras foram efetuadas técnicas distintas no que diz respeito aos alimentos e manipuladores. Os alimentos foram colhidos para análise após o embalamento efetuado na própria roulotte, sendo estes introduzidos em sacos esteréis e fechados, de modo a evitar posterior contaminação até ao momento da análise. Quanto aos manipuladores, realizou-se a “técnica de lavagem”, cujo processo consistiu em mergulhar as duas mãos num saco estéril contendo 100 mL do meio de cultura de enriquecimento *Água Peptonada Tamponada (bioMérieux)*, de acordo com Gustafson *et al* (2000) ⁽⁴¹⁾.

Todas as amostras foram transportadas numa mala térmica e depois mantidas num sistema de refrigeração até início da sua análise, realizada em 24h após a colheita. A cada amostra de alimento / manipulador recolhida foi atribuído um número interno, registado-se a composição, estabelecimento e data de recolha.

3.3- Preparação das amostras

Para a preparação das amostras dos alimentos efetuou-se o corte em pequenas porções e a pesagem de 3 tomas de 25 gramas, de modo a que cada uma destas fosse representativa da amostra a ser analisada, respeitando as regras de assepsia. Para tal, usou-se uma balança digital (*Kern Ew 1500-2M*), sendo posteriormente adicionado a cada toma o diluente, 225 ml de soro fisiológico, e os meios de cultura, 225 ml de *Água Peptonada Tamponada* e 225 ml de caldo de *Half Fraser (bioMérieux)*, de acordo com as normas da análise microbiológica de alimentos mencionados de seguida. Cada uma das tomas foi homogeneizada no aparelho “Stomacher” (*Lab-Blander 400*) durante 1 minuto.

Para efetuar os parâmetros que envolvem contagens foram efetuadas várias diluições decimais (até 10^{-5}).

Relativamente às amostras dos manipuladores, procedeu-se à agitação manual de cada uma delas, que consistia num saco de colheita contendo 100 ml do meio de enriquecimento *Água Peptonada Tamponada*.

3.4- Parâmetros microbiológicos

Os parâmetros microbiológicos efetuados nos alimentos e manipuladores incluíram a contagem da carga microbiana total através da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (ISO 4833:2003) ⁽⁴²⁾, a contagem e pesquisa de bioindicadores/indicadores de higiene e de microrganismos patogénicos. Os microrganismos bioindicadores/indicadores de higiene alvo de contagem e/ou pesquisa foram os coliformes (ISO 4832:2003) ⁽⁴³⁾, *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2:2004) ⁽⁴⁴⁾ e *Escherichia coli* (ISO 16649-2:2001 e AFNOR/NF BIO 12/20-12/06.2010) ^(45, 46). Os microrganismos patogénicos incluíram a contagem e/ou pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo (ISO 6888-1:1999;2003) ⁽⁴⁷⁾, pesquisa de *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1:2004) ⁽⁴⁸⁾ e pesquisa de *Salmonella* (ISO 6579:2002) ⁽⁴⁹⁾.

Para se proceder aos cálculos e posterior expressão dos resultados obtidos, seguiu-se a norma internacional ISO 7218 (2007) ⁽⁵⁰⁾, sendo depois estes apresentados em Unidades formadoras de colónias (UFC) por grama nos alimentos ou UFC por mão nos manipuladores. Os resultados para a pesquisa foram apresentados como “Ausência” ou “Presença” de determinado microrganismo por quantidade de amostra ou mão de manipulador.

3.4.1- Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos

Para este parâmetro, procedeu-se à inoculação de 1mL da suspensão-mãe (10^{-1}) e diluições decimais (10^{-2} a 10^{-5}) e sementeira por incorporação em meio *Plate Count Agar* (PCA, *Biogerm*). De seguida as placas foram colocadas a

incubar a 30°C por 72 horas, de acordo com a norma de referência ISO 4833 (2003) ⁽⁴²⁾.

Relativamente aos manipuladores, a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos foi realizada semeando diretamente 1 ml do meio usado para a recolha das amostras das mãos em PCA.

3.4.2- Contagem e pesquisa de *Enterobacteriaceae*

Para a contagem de *Enterobacteriaceae* nos alimentos efetuou-se a inoculação de 1mL da suspensão-mãe (10^{-1}) e diluições decimais (10^{-2} a 10^{-4}) e sementeira por incorporação em meio *Violet Red Bile Glucose Agar medium* (VRBG) (*Biogerm*). Posteriormente as placas foram colocadas incubadas a 37°C por 24±2 horas (ISO 21528-2: 2004) ⁽⁴²⁾. Para a pesquisa de *Enterobacteriaceae*, procedeu-se ao enriquecimento da amostra em *Água Peptonada Tamponada* por 24 horas a 37°C, seguindo-se depois a inoculação por esgotamento no mesmo meio utilizado na contagem.

Relativamente aos manipuladores, a contagem de *Enterobacteriaceae* foi realizada semeando diretamente 1 ml do meio usado para a recolha das amostras das mãos em VRBG e a pesquisa após enriquecimento em *Água Peptonada Tamponada* incubada a 37°C durante 18 horas e sementeira por esgotamento em meio VRBG.

A confirmação das colónias consistiu na repicagem de 5 colónias suspeitas para meio não seletivo *Cystine Lactose Electrolyte Deficient medium* (*Liofilchem*), incubado a 37°C durante 18 a 24 horas, e na realização da prova das oxídases e da prova de fermentação da glicose em meio OF-glucose, tal como descrito na norma de referência (ISO 21528-2: 2004) ⁽⁴⁴⁾.

3.4.3- Contagem e pesquisa de coliformes

Para a contagem de coliformes nos alimentos, efetuou-se a inoculação de 1mL da suspensão-mãe (10^{-1}) e diluições decimais (10^{-2} a 10^{-4}) e sementeira por incorporação em meio cromogénico *chromID Coli medium* (*BioMérieux*).

Posteriormente, as placas foram colocadas a incubar a 37°C por 18 a 24 horas, de acordo com a norma ISO 4832:2003 ⁽⁴³⁾ e AFNOR/NF BIO 12/20-12/06.2010 ⁽⁴⁶⁾. Para a pesquisa de coliformes, procedeu-se ao enriquecimento da amostra em *Água Peptonada Tamponada* por 24 horas a 37°C, seguindo-se depois a inoculação por esgotamento no mesmo meio cromogénico *chromID Coli medium* (BioMérieux). Esta técnica permitiu contar/detetar as colónias β-galactosidase positivas (coloração azul), características das estirpes de coliformes neste meio.

Nos manipuladores, a contagem de coliformes foi efetuada semeando diretamente 1 ml do meio usado para a recolha das amostras das mãos em *chromID Coli* e a pesquisa após enriquecimento em *Água Peptonada Tamponada* incubada a 37°C durante 18 horas e sementeira por esgotamento em meio *chromID Coli medium*.

3.4.4- Contagem e pesquisa de *Escherichia coli*

Para a contagem de *E. coli* nos alimentos, efetuou-se a inoculação de 1mL da suspensão-mãe (10^{-1}) e diluições decimais (10^{-2} a 10^{-4}) e sementeira por incorporação em meio cromogénico *chromID Coli medium* (BioMérieux). Posteriormente, as placas foram colocadas a incubar a 37°C por 18 a 24 horas, de acordo com a norma ISO 16649-2:2001 ⁽⁴⁵⁾ e AFNOR/NF BIO 12/20-12/06.2010 ⁽⁴⁶⁾. Para a pesquisa de *E. coli*, procedeu-se ao enriquecimento da amostra em *Água Peptonada Tamponada* por 24 horas a 37°C, seguindo-se depois a inoculação por esgotamento no mesmo meio cromogénico *chromID Coli medium* (BioMérieux). Esta técnica permitiu contar/detetar as colónias β-glucuronidase positivas (coloração rosa/violeta), características das estirpes de *E. coli*.

Nos manipuladores, a contagem de *E. coli* foi efetuada semeando diretamente 1 ml do meio usado para a recolha das amostras das mãos em *chromID Coli* e a pesquisa após enriquecimento em *Água Peptonada Tamponada* incubada a 37°C durante 18 horas e sementeira por esgotamento em meio *chromID Coli medium*.

De cada amostra, foram selecionadas várias colónias suspeitas de *E. coli* para posterior confirmação por métodos fenotípicos e genotípicos. Foi efetuada uma nova repicagem para meio cromogénico *Tryptone-bile-glucuronidase medium*

(*Biogerm*), incubado a $44\pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 a 24 horas, e em alguns casos foi efetuada a identificação pelo sistema *API 20E* (*BioMérieux*), antes de se proceder à caracterização dos isolados por técnicas de biologia molecular, descritas em 3.4.3.1.

3.4.4.1- Caracterização dos isolados de *Escherichia coli*

As colónias de *E. coli* confirmadas como sendo produtoras de β -glucuronidase (máximo de 5 por amostra) foram posteriormente caracterizadas por métodos moleculares, através de dois ensaios de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), um ensaio para amplificação do rDNA 16S para confirmação da espécie ⁽⁵¹⁾ e outro para determinação dos grupos filogenéticos ⁽⁵²⁾. Para a determinação dos grupos filogenéticos nos isolados suspeitos de *E. coli* foi realizado um PCR multiplex, que consistiu na amplificação de três zonas alvo: os genes *chuA* e *yjaA* e o fragmento TspE4C2. Os isolados de *E. coli* classificam-se em quatro grupos filogenéticos principais (A, B1, B2 e D), sendo que habitualmente os membros dos grupos B2 e D são considerados potencialmente patogénicos por serem maioritariamente associados a infeções extra-intestinais e os membros dos grupos A e B1 comensais de animais e do Homem, podendo também ser portadores de genes que codificam para fatores de virulência ⁽⁵²⁾. Com esta caracterização pretendeu-se obter alguma informação sobre a possível origem da contaminação e/ou de contaminação cruzada nos estabelecimentos analisados e correlacionar os resultados obtidos nos manipuladores com os encontrados nos respetivos alimentos.

As condições gerais para a realização e interpretação dos ensaios de PCR encontram-se sumariadas nas alíneas A1 (obtenção do DNA total), A2 (condições de amplificação) e A3 (electroforese em gel de agarose).

A1- Obtenção do DNA total

O DNA total dos isolados de *E. coli* foi obtido pelo método descrito por Seifert *et al* (1997) ⁽⁵³⁾. Previamente, efetuou-se o isolamento dos isolados submetidos a

PCR em meio CLED após incubação a 37°C durante 18 a 24 horas. De cada placa foi retirada uma porção, 2 a 3 colónias, para efetuar uma suspensão em 20µl de solução NAOH-SDS (0,05 M NAOH; 0,25% SDS) em tubos de PCR, posteriormente sujeitos a uma fase de lise a 95°C no termociclador, durante 15 minutos. Após essa etapa adicionou-se a cada tubo 180 µL de TE 1x (10mM Tris: 1mM EDTA, pH 8,0), em seguida, colocaram-se os tubos numa centrífuga a 13000 rpm durante 3 minutos. Os sobrenadantes obtidos de cada tubo, contendo DNA, foram transferidos para tubos *ependorf* de 1,5mL e conservados a -20°C para utilização posterior nas várias reações de PCR.

A2- Condições de amplificação

Todas as condições necessárias para amplificação dos genes pesquisados neste trabalho encontram-se descritas nas tabelas 1 e 2 (Anexos), tal como os respetivos *primers*, condições de amplificação, reagentes e tamanho do produto amplificado, quando aplicável. Foram incluídos controlos positivos e brancos, em todas as reações de PCR. Para a amplificação desejada usou-se o termociclador *C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD)*.

A3- Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das reações de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% (*SeaKem® LE Agarose, Lonza*) em tampão TAE 1x (Tris-base 40mM, EDTA 1mM, ácido acético glacial, pH 8,0) com corante *Midori Green Advanced DNA stain (Gencius)* a 90V durante cerca de 45 minutos. A obtenção da imagem dos géis fez-se através do aparelho *Molecular Image® Gel Doc™ XR+ with ImageLab Software (BIO-RAD)*. O tamanho dos fragmentos foi calculado por comparação com pelo menos um controlo positivo e um marcador de peso molecular.

3.4.5- Contagem e pesquisa de *Staphylococcus Coagulase Positivo*

Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo nos alimentos efetuou-se a inoculação de 1mL da suspensão-mãe (10^{-1}) à superfície de 3 placas do meio de *Baird Parker Agar* (BPA) (*Biogerm*). De seguida, estas placas foram colocadas a incubar a 37°C por 24 a 48 horas, de acordo com a ISO 6888-1:1999; 2003 ⁽⁴⁷⁾. Para a pesquisa, procedeu-se ao enriquecimento da amostra em *Água Peptonada Tamponada* por 24 horas a 37°C, seguindo-se depois a inoculação por esgotamento no meio BPA. Nos manipuladores, a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo foi efetuada semeando diretamente 1 ml do meio usado para a recolha das amostras das mãos em meio BPA e a pesquisa após enriquecimento em *Água Peptonada Tamponada* incubada a 37°C durante 18 horas e sementeira por esgotamento em meio BPA.

Para a confirmação das colónias suspeitas de *Staphylococcus* coagulase positivo repicaram-se até 5 colónias suspeitas para o meio nutritivo *Brain Heart Infusion agar* (BHI agar) (*Liofilchem*), incubado durante 20 a 24 horas a 37°C. Posteriormente, efetuou-se a prova da coagulase em plasma de coelho liofilizado (*Liofilchem*) a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 4 a 6 horas e até 24 horas, quando necessário.

3.4.6- Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada apenas nas amostras de alimentos, de acordo com a norma ISO 11290-1: 2004 ⁽⁴⁸⁾. O procedimento dividiu-se em quatro etapas: pré-Enriquecimento em meio *Half Fraser broth* (*bioMérieux*), incubação a 30°C durante 24 ± 3 horas; enriquecimento em meio *Fraser broth* (*bioMérieux*) durante 48 ± 3 horas a 37°C; isolamento em *Agar Listeria Ottaviani Agosti medium* (ALOA) (*Biogerm*) e em *Oxford agar medium* (*Biogerm*), ambos durante 24/48 horas a 37°C e posterior confirmação das colónias suspeitas de *L. monocytogenes*, através de provas bioquímicas. Nas amostras em que se verificou colónias suspeitas de *L. monocytogenes* foram selecionadas até 5 colónias por placa, sendo efetuado o seu reisolamento em meio *Columbia 5% sangue carneiro* (*biogerm*). Os isolados em que se observou β -hemólise foram

identificados ao nível da espécie pelo sistema miniaturizado *API Listeria* (*bioMérieux*).

3.4.7- Pesquisa de *Salmonella*

3.4.7.1 Método convencional

Para a pesquisa de *Salmonella* foi utilizado o mesmo método, quer para as amostras de alimentos, quer para as de manipuladores, de acordo com a norma ISO 6579: 2002 ⁽⁴⁹⁾. Como tal, e conforme descrito na norma referida, esta técnica dividiu-se em quatro etapas: pré-enriquecimento em *Água Peptonada Tamponada* com incubação a 37°C durante 18±2 horas; enriquecimento seletivo em *Rappaport-Vassiliadis medium with Soya broth* (RVS) (*bioMérieux*) e *Mueller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth* (MKTTn) (*bioMérieux*), com incubação a 37°C e 41,5°C, respetivamente, durante 24±3 horas; isolamento em *Xylose lysine deoxycholate agar medium* (XLD) (*Liofilchem*) e em meio cromogénico *CHROMagar Salmonella* (*Biogerm*) durante 24±3 horas a 37°C e identificação de colónias suspeitas, através de provas bioquímicas e serológicas.

3.4.7.2 Método molecular

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos através do método clássico utilizado para a pesquisa de *Salmonella* (3.4.6.1) realizou-se um PCR para a pesquisa de um gene de virulência, gene *invA* (presente na maioria dos isolados de *Salmonella*), diretamente no DNA extraído do meio de pré-enriquecimento, de acordo com o descrito por Mainar-Jaime *et al* ⁽⁵⁴⁾. O procedimento para a extração do DNA consistiu em: i) centrifugar 1 mL de *Água Peptonada Tamponada* de cada amostra a 13000 rpm durante 10 minutos; ii) rejeitar o sobrenadante e adicionar 100 µL de água destilada ao *pellet* obtido e ressuspender; iii) colocar o tubo a ferver durante 20 minutos a 95°C; iv) centrifugar a 4000 rpm durante 4 minutos; v) armazenar o sobrenadante num novo tubo de 1,5ml e conservar a 4°C para utilização futura.

Os reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado para a reação de PCR usada para a pesquisa do gene *invA* encontram-se descritos na

Tabela 2 do Anexo, assim como as sequências nucleotídicas dos *primers* que se encontram na Tabela 4 do mesmo anexo. As condições utilizadas para a eletroforese em gel de agarose encontram-se descritas no capítulo 3.4.4.1 (A3).

3.5. Critérios microbiológicos

As amostras dos alimentos foram classificadas como Satisfatórias, Aceitáveis, Não Satisfatórias ou Inaceitáveis/Potencialmente Perigosas, com base nos Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos-a-comer preparados em estabelecimentos de restauração, publicados pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge ⁽⁵⁵⁾.

No caso dos manipuladores, uma vez que não existem Valores Guia publicados para a interpretação das análises às mãos, foi considerado neste estudo como estado higiénico satisfatório a “Ausência” de *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella*. Estes critérios são preconizados também por outros autores para a interpretação dos resultados de análises microbiológicas de mãos de manipuladores de alimentos ⁽⁵⁶⁾.

4- Resultados e discussão

Neste estudo, observou-se que todas as amostras de “cachorros-quentes” (n=10) e de “hambúrgueres em pão” (n=10), adquiridas em 10 estabelecimentos de restauração móveis, apresentaram qualidade microbiológica “não satisfatória” para pelo menos dois dos parâmetros analisados, segundo os critérios microbiológicos nacionais para alimentos prontos a comer cozinhados com adição de ingredientes crus ⁽⁵⁵⁾. Estes resultados ficaram a dever-se a parâmetros indicadores de alteração não diretamente relacionados com a segurança (contagens de aeróbios mesófilos) e aos bioindicadores/indicadores de higiene (contagens de *Enterobacteriaceae*, coliformes e *Escherichia coli*), mas também à presença de microrganismos patogénicos (*Listeria monocytogenes*) (**Figura 3**). Com exceção do parâmetro *E. coli*, onde a percentagem de hambúrgueres considerados não satisfatórios (40%) foi superior à de cachorros-quentes (10%), não se verificaram diferenças entre os dois tipos de alimentos quanto aos parâmetros microbiológicos analisados.

Adicionalmente, tendo o manipulador de alimentos um papel fulcral nas unidades de alimentação coletiva, uma vez que poderá ser responsável pela contaminação dos alimentos com microrganismos causadores de doenças de origem alimentar, por inadequada higiene pessoal ou práticas de contaminação cruzada ^(57, 58), procedeu-se à análise microbiológica das mãos dos manipuladores (n=9), tendo sido obtido consentimento em 7 (roulottes A, B, C, D, F, G e I) das 10 roulettes. Assim, verificou-se que todos os manipuladores apresentaram um estado higiénico das mãos “não satisfatório” para pelo menos dois dos parâmetros analisados (**Figura 3**), incluindo presença de indicadores de higiene (*Enterobacteriaceae*, coliformes e/ou *E. coli*) e/ou de um grupo de bactérias potencialmente patogénicas (*Staphylococcus* coagulase positivo) que também poderá funcionar como indicador de higiene das mãos.

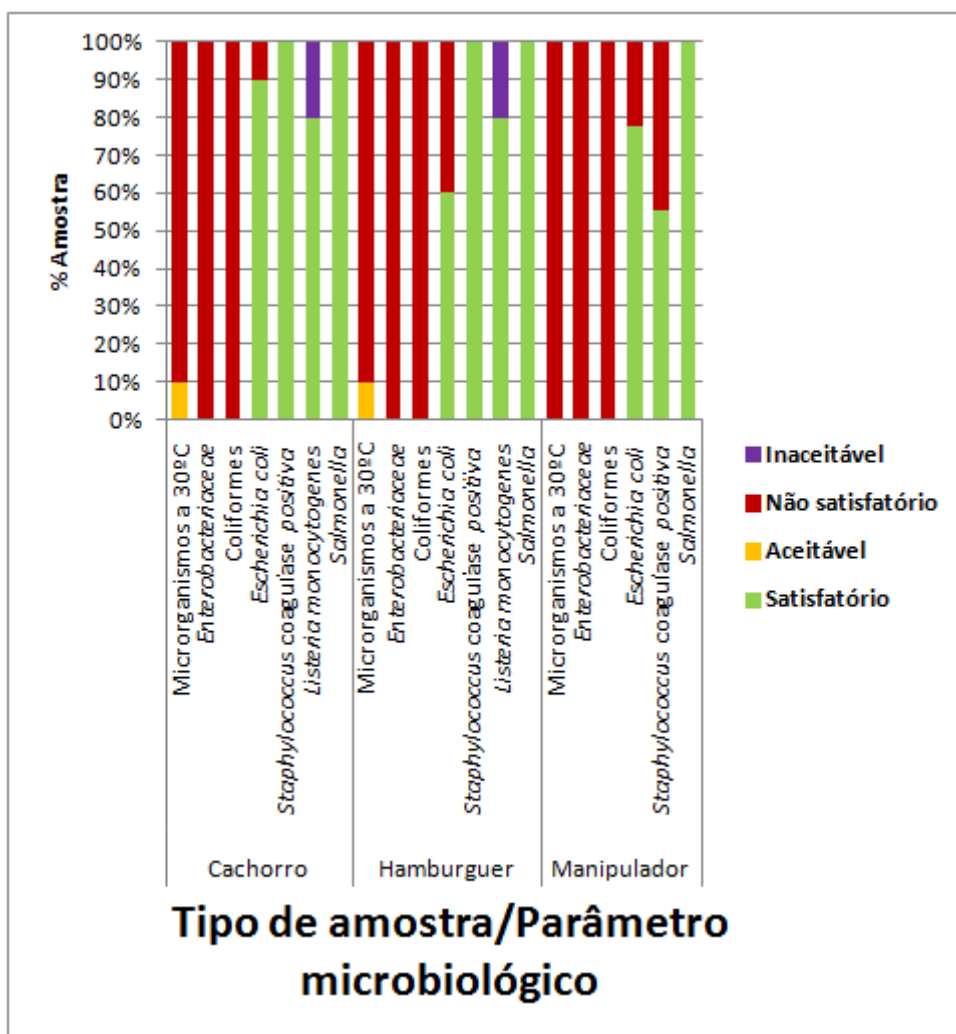


Figura 3: Frequência de amostras classificadas em satisfatórias, aceitáveis, não satisfatórias e inaceitáveis, por parâmetro microbiológico e tipo de amostra

De salientar que os manipuladores que apresentaram pior estado higiênico das mãos, por exemplo onde se confirmou presença de *E. coli* (roulottes D e F) ou *Staphylococcus coagulase positiva* (roulottes C, G e I), produziram os alimentos de pior qualidade microbiológica. Assim, é de realçar a presença de *E. coli* em níveis não satisfatórios nos alimentos das roulottes C, D e I (para além das roulottes H e J) e elevada carga de *Enterobacteriaceae*/coliformes nos alimentos da roulotte F.

4.1 Indicadores de alteração

Em 90% das amostras (n=18/20) dos alimentos prontos-a-comer verificou-se que o número de microrganismos aeróbios mesófilos ultrapassou valores de 10^5 UFC/g, sendo classificadas como “não satisfatórias” (**Figura 4**), de acordo com os critérios do INSA ⁽⁵⁵⁾. A carga microbiana total destas amostras foi elevada, variando entre $1,1 \times 10^6$ e $> 3,0 \times 10^7$ UFC/g nos cachorros-quentes e entre $2,9 \times 10^5$ e $> 3,0 \times 10^7$ UFC/g nos hambúrgueres, representando todas as unidades de restauração analisadas. As restantes 2 amostras, provenientes de um cachorro- quente e de um hambúrguer, obtidas de diferentes unidades de restauração (roulotte A e D), foram classificadas como “Aceitáveis” atingindo valores de $5,7 \times 10^4$ e de $2,1 \times 10^4$ UFC/g, respetivamente.

Apesar da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos ser um parâmetro microbiológico não diretamente relacionado com a saúde do consumidor, reflete a qualidade da matéria-prima utilizada e as práticas adotadas durante toda a cadeia de produção, nomeadamente as condições de processamento, manuseamento e armazenamento ^(58, 59). No entanto, não permite uma avaliação segura dos alimentos prontos a comer ⁽⁶⁰⁾, pois geralmente verifica-se a sua presença em níveis elevados em alimentos crus (ex. saladas) e em alimentos cujas fases de processamento estão sujeitos a fatores ambientais, indicando apenas problemas de qualidade da matéria-prima e possíveis falhas no controlo da temperatura ^(60, 14).

Relativamente à carga total de microrganismos nas mãos dos manipuladores verificou-se que todas as amostras, com exceção de uma, apresentaram valores superiores a $1,5 \times 10^4$ UFC/mão. Apesar de não existirem critérios microbiológicos nacionais estabelecidos para manipuladores de alimentos relativamente a microrganismos aeróbios mesófilos, os valores encontrados foram considerados não satisfatórios, segundo os critérios estabelecidos por Careli *et al* ⁽⁵⁹⁾ que preconiza contagens abaixo de 100 UFC/mão.

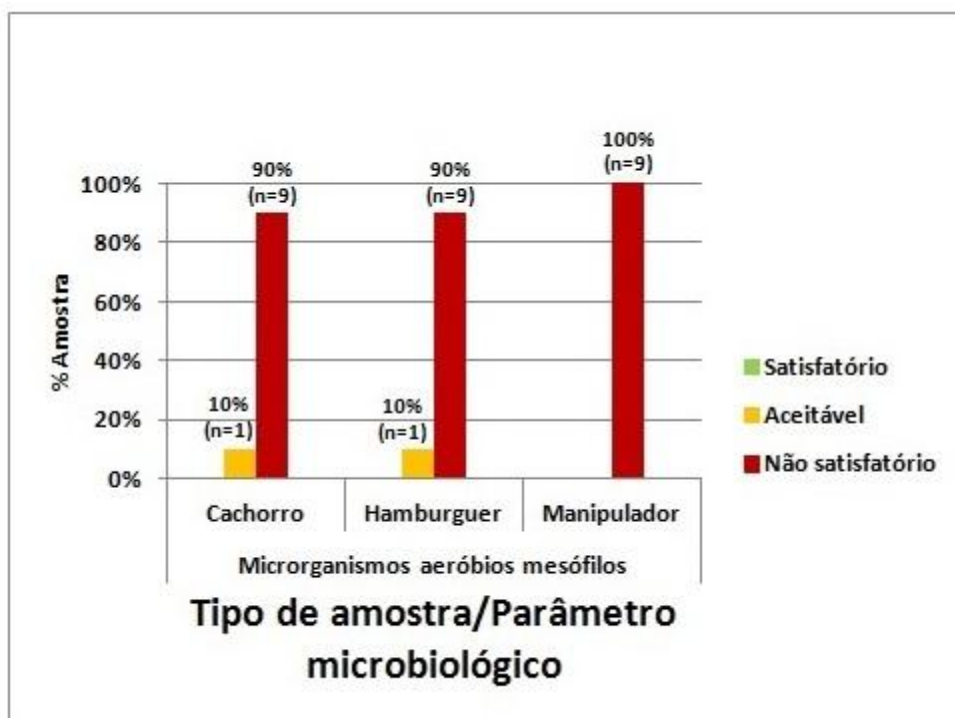


Figura 4: Frequência de amostras classificadas em satisfatórias, aceitáveis, e não satisfatórias para o parâmetro microrganismos aeróbios mesófilos por tipo de amostra.

4.2 Bioindicadores/Indicadores de higiene

Relativamente aos bioindicadores de contaminação verificou-se que todas as amostras de alimentos (n=20), adquiridas nas 10 roulottes, se encontravam “não satisfatórias” ($> 10^3$ UFC/g) para *Enterobacteriaceae* e coliformes (**Figura 5**), de acordo com os critérios do INSA ⁽⁵⁵⁾. As amostras dos cachorros-quentes apresentaram valores que variaram entre $1,2 \times 10^3$ e $1,1 \times 10^6$ UFC/g, sendo a maioria $> 10^4$ UFC/g (n=8 para *Enterobacteriaceae* e n=8 para coliformes). Os hambúrgueres em pão apresentaram valores entre $2,6 \times 10^3$ e $1,8 \times 10^6$ UFC/g, sendo a maioria $> 10^5$ UFC/g (n=5 para *Enterobacteriaceae* e n=7 para coliformes). Também todas as amostras das mãos dos 9 manipuladores, participantes neste estudo, se apresentaram com estado higiénico “não satisfatório”, quer para presença de *Enterobacteriaceae*, quer de coliformes (**Figura 5**). Para *Enterobacteriaceae*, 5 manipuladores, funcionários de 4 roulottes, apresentaram mesmo valores elevados, entre $1,7 \times 10^3$ e $> 7,5 \times 10^3$ UFC/mão, e para coliformes, 4 manipuladores, de 3 roulottes, apresentaram valores entre $1,0 \times 10^3$ UFC/mão e

$>7,5 \times 10^3$ UFC/mão. Salienta-se que os manipuladores que apresentavam maior carga de coliformes também eram os que exibiam maior carga de *Enterobacteriaceae*.

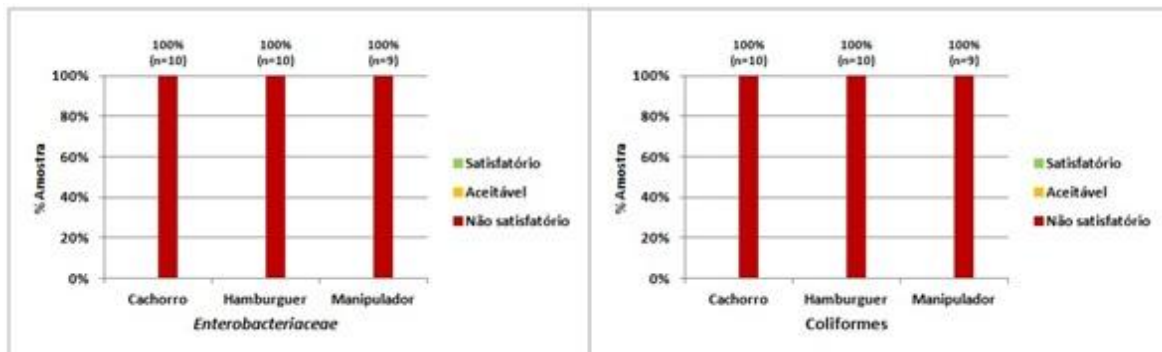


Figura 5: Frequência de amostras classificadas em satisfatórias, aceitáveis, e não satisfatórias para os parâmetros *Enterobacteriaceae* (esquerda) e coliformes (direita) por tipo de amostra.

O grupo de microrganismos utilizados como bioindicadores inclui majoritariamente microrganismos que fazem parte da flora intestinal normal dos animais, incluindo dos humanos, permitindo avaliar o estado geral de higiene de um alimento ^(60, 61). A presença de um bioindicador de contaminação nos alimentos prontos a comer é útil na avaliação da segurança dos alimentos, pois apesar de não serem microrganismos patogênicos indicam a probabilidade da sua presença ⁽⁶⁰⁾. Uma vez que os bioindicadores são mais facilmente identificados e quantificados, pois tendem a estar presentes em maior número, permitem-nos tirar ilações quanto às possíveis causas de contaminação que podem englobar fatores como contaminação cruzada a partir de alimentos crus (ex. carne e vegetais), contacto com manipuladores e superfícies contaminadas e falhas no controlo do tempo e temperatura de confeção ⁽⁶⁰⁾.

Apesar do grupo das *Enterobacteriaceae* e o dos coliformes serem bioindicadores de higiene com algumas limitações, por incluírem espécies bacterianas de origem ambiental, a presença destes em níveis elevados em alimentos prontos-a-comer, como os cachorros-quentes e os hambúrgueres, sugere um mau estado geral de higiene dos produtos alimentares ^(60, 14). Tal situação pode ser consequência de diversas falhas como a ocorrência de contaminação cruzada, falta de higiene por parte do manipulador ou mesmo má

qualidade da matéria-prima ⁽⁶⁰⁾. Adicionalmente, a presença dos bioindicadores em alimentos sujeitos a processos térmicos poderá também indicar controlo do tempo e temperatura inadequados e/ou contaminação após confeção ou cozedura, uma vez que estas bactérias são eliminadas pelos processamento térmicos utilizados na preparação dos alimentos. Além disso, estas bactérias também podem ser removidas de superfícies e equipamentos após procedimentos de limpeza adequados ⁽⁶⁰⁾.

De facto, aquando da recolha das amostras foram evidenciados certos comportamentos inadequados para qualquer profissional ligado à área da restauração. Salienta-se a não lavagem de mãos em nenhuma das fases da preparação e/ou confeção dos alimentos, a presença de mãos visivelmente sujas, principalmente na zona das unhas, o uso de adornos excessivos e a prática de consumo de outros alimentos durante a confeção dos alimentos para venda. A prática deste tipo de hábitos de higiene pessoal e/ou profissional afeta diretamente a obtenção de alimentos seguros, tal como sugerido pelos diversos códigos de boas-práticas de higiene e segurança alimentar ^(62, 63). Tendo em conta estas atitudes e comportamentos, não foi de estranhar que, quer os manipuladores, quer os próprios alimentos, apresentassem uma apreciação da qualidade microbiológica negativa para os bioindicadores de higiene, tal como sugerido por vários autores ^(64, 65). Por exemplo, Trick *et al* ⁽⁶⁵⁾ verificaram no seu estudo relativamente ao uso de anéis e o seu contributo para um aumento da carga de microrganismos nas mãos que ocorria um aumento da frequência de bacilos Gram negativo, incluindo *Enterobacteriaceae* e coliformes, e *Staphylococcus aureus*, entre outros microrganismos, principalmente quando havia uso de vários anéis ⁽⁶⁵⁾.

No grupo dos bioindicadores, *E.coli* continua a ser o parâmetro indicador de higiene dos alimentos/manipuladores de referência, uma vez que é possível correlacionar a sua presença/número com contaminação fecal ⁽⁶⁰⁾. Neste estudo, verificou-se que 5 das 20 (25%) amostras de alimentos analisadas apresentaram valores >10 UFC/g, sendo consideradas “não satisfatórias” (**Figura 6**), de acordo com os critérios do INSA ⁽⁵⁵⁾. Estas amostras corresponderam a um cachorro- quente obtido numa roulotte (D), com valores de $3,0 \times 10^4$ UFC/g, e a 4 hambúrgueres de 4 roulottes diferentes (C, H, I e J), cujos valores variaram entre $1,0 \times 10^2$ e $2,0 \times 10^4$ UFC/g. No entanto, salienta-se que após a etapa de

enriquecimento, 65% (n=13/20) das amostras de ambos os tipos de alimentos e de 8 estabelecimentos móveis (A, B, C, D, F, H, I e J) continham isolados de *E. coli*.

Considerando a pesquisa de *E. coli* nas amostras das mãos dos manipuladores, verificou-se que apenas dois (22%) manipuladores, das roulettes D e F, apresentaram um estado higiénico “não satisfatório”, com valores de 1.5×10^2 UFC/mão e de < 50 UFC/mão, respetivamente. Nas mãos dos restantes 7 manipuladores de 6 roulettes, que aceitaram participar no estudo, não se detetou a presença de *E. coli*, sendo considerado estado de higiene “satisfatório” (Figura 5). Em contraste, no estudo de Abreu *et al* ⁽³⁹⁾ foi verificada a presença de *E. coli* em 63% das amostras recolhidas das mãos de manipuladores, tendo estes autores concluído que este alto índice de contaminação se relaciona com a falta de qualificações dos manipuladores e com deficiências estruturais do ambiente de trabalho ⁽³⁹⁾. Relativamente aos alimentos produzidos nas unidades com manipuladores positivos foi verificada a presença de *E. coli*, quer no cachorro-quente da roulette D em níveis não satisfatórios, quer nos 2 alimentos analisados da roulette F. No entanto, os isolados de *E. coli* provenientes dos alimentos e dos manipuladores das roulettes D e F não foram coincidentes em relação aos grupos filogenéticos dos isolados estudados. Contudo, este facto não descarta a responsabilidade do manipulador analisado relativamente ao estado higiénico dos alimentos preparados e poderá sugerir que a preparação dos ingredientes utilizados para preparar os alimentos prontos-a-comer analisados neste estudo podia ter sido efetuada previamente por outro funcionário da roulette. Adicionalmente, tendo em conta a metodologia utilizada na seleção de isolados representativos de cada amostra (no máximo de 5 colónias) não podemos descartar a possibilidade de contaminação entre o manipulador analisado e os alimentos vendidos na mesma unidade móvel.

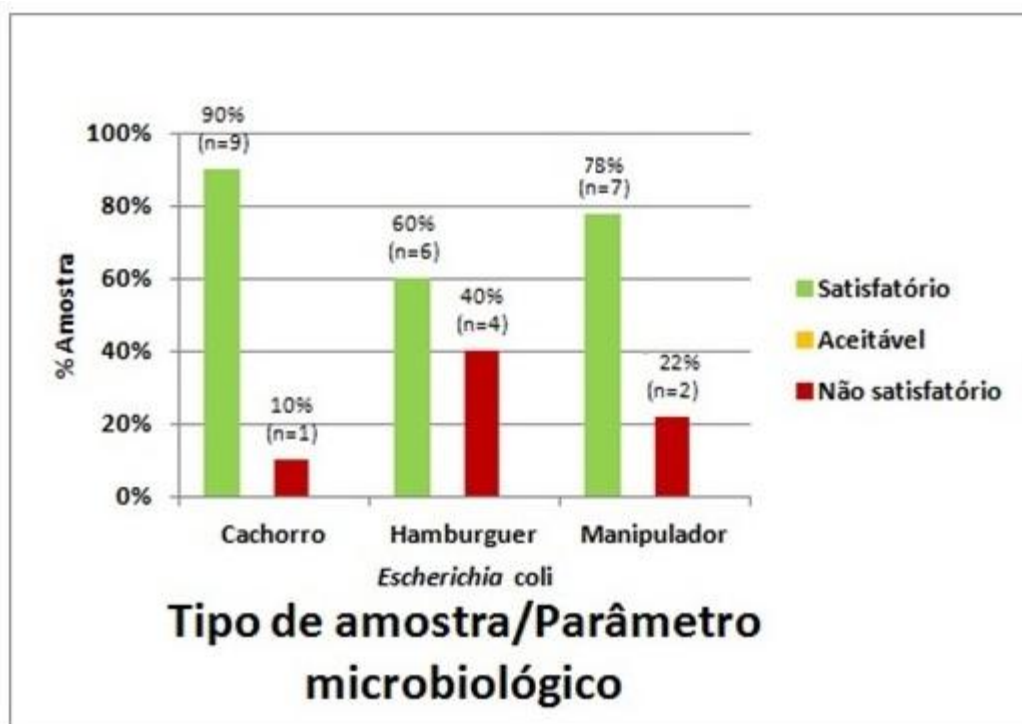


Figura 6: Frequência de amostras classificadas em satisfatórias, aceitáveis e não satisfatórias para o parâmetro *Escherichia coli* por tipo de amostra.

Das amostras de alimentos e dos manipuladores foram selecionados para caracterização molecular 31 isolados de *E. coli*, que quanto à sua estrutura populacional se distribuíram pelos grupos filogenéticos A0 (n=12/31; 39%), A1 (n=9/31; 29%) e B1 (n=10/31; 32%) (**Figura 7**). Neste estudo, verificou-se a presença de isolados de *E. coli* pertencentes a diversos grupos filogenéticos, incluindo os habitualmente mais disseminados em amostras de alimentos ⁽⁵²⁾. Todos os isolados de *E. coli* obtidos nos 2 tipos de alimentos prontos a comer analisados pertencem aos grupos filogenéticos A e B1, considerados habitualmente comensais de animais e de humanos, tal como descrito por outros autores ⁽⁵²⁾, sugerindo possível contaminação fecal através das mãos por contaminação cruzada durante a preparação dos alimentos prontos-a-comer.

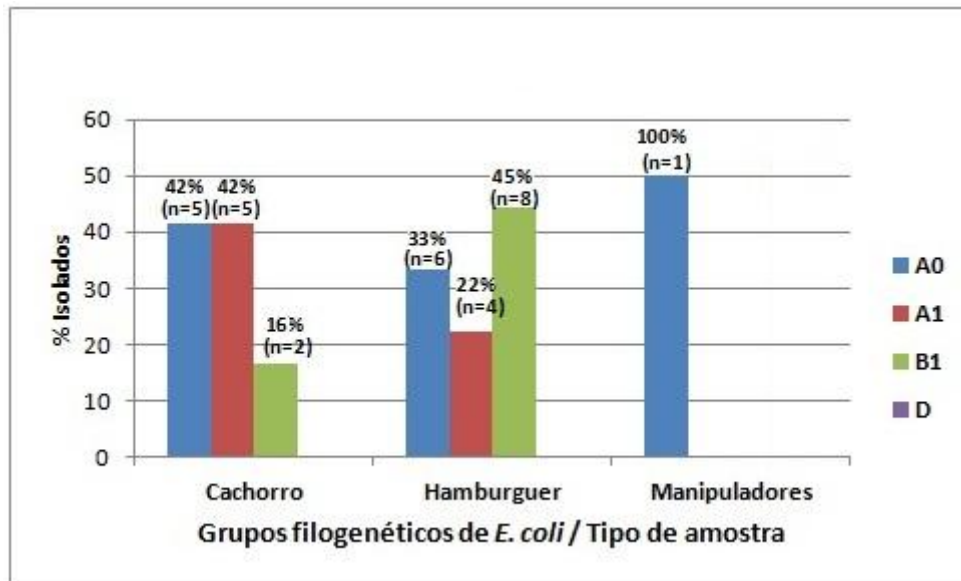


Figura 7: Grupos filogenéticos dos isolados de *Escherichia coli* (n=31) por tipo de amostra.

4.3 Microrganismos patogénicos

No que concerne aos microrganismos patogénicos pesquisados neste estudo, todas as amostras de alimentos analisadas foram consideradas “satisfatórias” para *Salmonella* (ausência em 25g) e *Staphylococcus* coagulase positivo (**Figura 8**), com valores <10 UFC/g para todas as amostras com exceção de uma (6x10 UFC/g). Noutro estudo em alimentos prontos-a-comer tipo cachorro-quente no Brasil também não se verificou a presença de *Salmonella*, mesmo quando a análise microbiológica foi efetuada nas estações do ano mais quentes, o que contrasta com o presente estudo efetuado no Inverno ⁽¹⁴⁾. De facto, Rodrigues *et al* ⁽¹⁴⁾ evidenciou que a qualidade microbiológica das amostras de cachorros-quentes foi pior nos períodos de maior calor para diversos parâmetros (ex. bactérias aeróbias mesófilas, coliformes e *Staphylococcus coagulase positivo*). No entanto, vários surtos têm sido associados a alimentos prontos-a-comer tipo *fast-food* tal como o ocorrido em 2012 no Brasil (Porto Alegre) associado a uma cadeia de estabelecimentos *fast-food*, onde a maioria das amostras de hambúrgueres e dos molhos estavam contaminados com *Salmonella*, sendo responsáveis pelo menos por 213 casos de salmonelose ⁽⁶⁶⁾. Também Aragon-Alegro *et al* ⁽⁶⁷⁾ no seu estudo com 172 amostras alimentares comercializadas em

Botucatu (Brasil), verificou que 40% estavam em desacordo com as normas estabelecidas, assim como 11 das 26 amostras (15%) onde foi verificada a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo, sugerindo que estes alimentos, incluindo de venda, podem constituir um importante veículo de transmissão de bactérias patogênicas ⁽⁶⁷⁾.

Neste estudo, foi detetada a presença de *Listeria monocytogenes* em duas amostras de cada um dos tipos de alimentos analisados (n=4/20, 20%) (**Figura 8**), adquiridos em 3 das roulettes (n=3/10, 30%; C, D e J), sendo considerados “inaceitáveis” ou “potencialmente perigosos” para a saúde do consumidor, de acordo com os critérios do INSA ⁽⁵⁵⁾. De salientar que na roulette J ambos os alimentos (cahorro-quente e hamburguer) estavam contaminados com esta bactéria patogênicas.

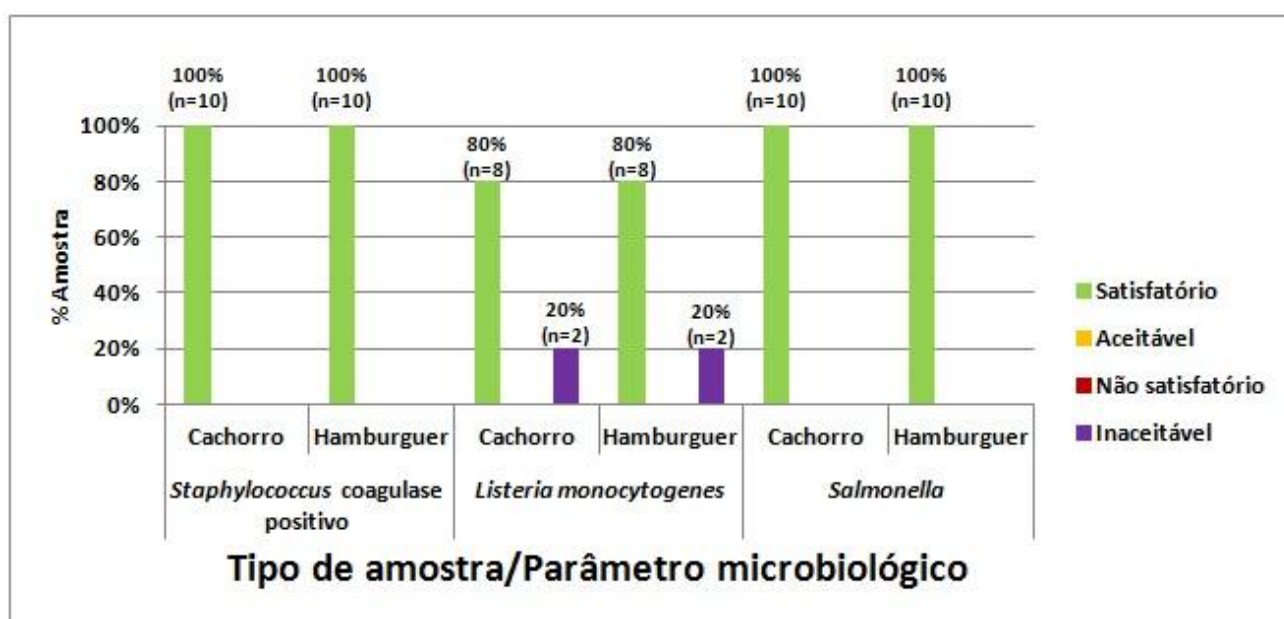


Figura 8: Frequência de amostras de alimentos classificadas em satisfatórias, aceitáveis, não satisfatórias e inaceitáveis para os parâmetros *Staphylococcus* coagulase positivo, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*.

Atualmente, *L. monocytogenes* é considerada um dos agentes de doenças de origem alimentar emergentes, associado a infecções graves com uma elevada taxa de mortalidade nos grupos de risco (idosos, imunodeprimidos, grávidas), de acordo com os dados publicados pela EFSA ⁽³¹⁾. Diversos surtos de listeriose têm sido relatados em diversas zonas da Europa e América do Norte ⁽⁶⁸⁾. *L.*

monocytogenes é responsável nos Estados Unidos por cerca de 2.500 casos de doenças transmitidas por alimentos anualmente, das quais 500 casos são fatais, sendo o custo de casos agudos de listeriose seja de cerca de 2,3 bilhões de dólares ⁽⁶⁸⁾. No entanto, em Portugal os registos de casos/surtos de listeriose são praticamente inexistentes, uma vez que não há sistema de vigilância nem a doença é de declaração obrigatória, sendo os dados sobre a presença de *L. monocytogenes* em alimentos escassos ⁽³¹⁾. Nos países onde existem sistemas de vigilância para *L. monocytogenes*, os alimentos mais frequentemente associados a esta doença são o leite e derivados (ex. queijo), produtos de salsicharia e enchidos e hortícolas, incluindo-se alimentos prontos a comer de diversos grupos ⁽³¹⁾.

Sendo *L. monocytogenes* uma bactéria ubíqua (disseminada no ambiente e nos animais) e psicotrófica (com capacidade de crescimento a temperaturas de refrigeração) todos os alimentos de origem animal ou vegetal crus e os alimentos prontos-a-comer mantidos sob refrigeração durante o seu período de vida podem estar contaminados com esta bactéria patogénica ^(31, 69). Desta forma, sabendo que todas as amostras analisadas continham na sua composição produtos cárneos (ex. salsichas) e hortícolas crus, nomeadamente alface e couve-roxa, sugere que estes ingredientes dos cachorros-quentes e dos hamburgueres em pão possam ser a origem da contaminação. Relativamente aos hortícolas crus, a utilização de procedimentos de higiene inadequados ou insuficientes na sua lavagem e desinfeção e/ou a utilização de produtos refrigerados já pouco frescos poderão ter permitido o crescimento de *L. monocytogenes* ^(31, 60, 69, 70). Adicionalmente, o ambiente que rodeia os alimentos aquando da sua manipulação pode ter um impacto significativo na segurança e qualidade microbiológica, sobretudo para alimentos prontos-a-comer ^(32, 14). As instalações e equipamentos podem ser fontes prováveis de contaminação, favorecendo assim o aparecimento de comunidades de microrganismos (designadas de biofilmes), que podem permanecer durante meses ou anos, especialmente se não forem adotadas boas práticas de fabrico, constituindo vias permanentes de transmissão para os alimentos ⁽⁶⁹⁾. A transferência de bactérias a partir de utensílios e equipamentos é atualmente considerada uma causa importante de transmissão de doenças de origem alimentar ⁽³²⁾. Vários estudos demonstraram que *L. monocytogenes* pode sobreviver em equipamentos de processamento, tais como

cortadores de carne, tornando-se assim numa fonte potencial de contaminação ^(71, 72). Vários surtos causados por *L. monocytogenes* e *Salmonella* têm reforçado a ideia de que estes patogênicos podem permanecer no ambiente de processamento contaminado ⁽³²⁾.

Relativamente aos resultados da pesquisa de microrganismos patogênicos nos manipuladores verificou-se que todas as amostras de mãos analisadas se encontravam “satisfatórias” no que diz respeito à presença de *Salmonella* (**Figura 9**). Contudo, foi detetada a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo nas mãos de 4 manipuladores, de 3 roulettes (C, G e I), sendo considerado estado de higiene “não satisfatório” (**Figura 9**). Uma das amostras (manipulador da roulette C) apresentou mesmo valores superiores a $7,5 \times 10^3$ UFC/mão (as outras 3 amostras < 50 UFC/mão).

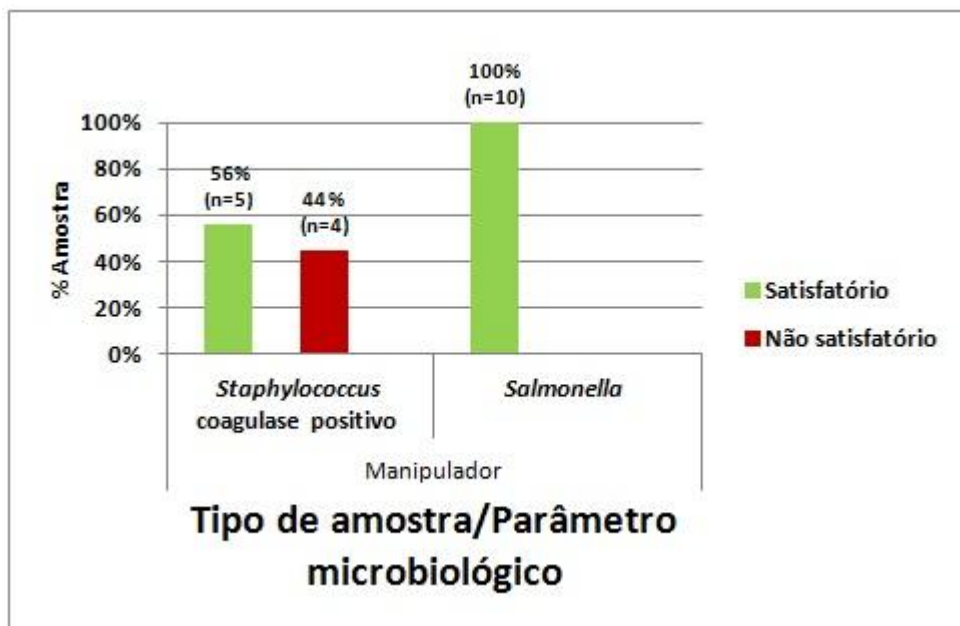


Figura 9: Frequência de amostras dos manipuladores classificadas em satisfatórias e não satisfatórias para os parâmetros *Staphylococcus* coagulase positivo e *Salmonella*.

O principal reservatório de *Staphylococcus* é o Homem, sendo frequente a presença desta bactéria na pele ^(15, 57) e membranas mucosas (oral e nasal) do Homem e de outros animais de sangue quente ⁽⁵⁷⁾. Na cavidade nasal, a prevalência de *S.aureus* pode variar entre 20 a 50% na população adulta

saudável ^(57, 72). Tendo em consideração o reservatório das espécies de *Staphylococcus*, os alimentos podem ser contaminados por manipuladores de alimentos, quer através da transmissão destas bactérias a partir da pele ⁽¹⁵⁾, quer pelas gotículas respiratórias (ex. tosse e espirros) sobre os alimentos. No género *Staphylococcus*, a espécie *S. aureus* é a que está mais associada com casos/surtos ⁽⁵⁷⁾, continuando a ser um dos agentes mais frequentes de intoxicação alimentar. Assim, vários autores ^(57, 58, 73) também obtiveram resultados insatisfatórios no que diz respeito a higiene das mãos dos profissionais da área alimentar, tendo identificado *Staphylococcus aureus* em diversas amostras, podendo comprometer a saúde dos consumidores. De facto, têm sido relatados vários surtos de intoxicação alimentar por *S. aureus* associados a manipuladores ⁽⁴⁰⁾. Por exemplo, Wei e Chiou ⁽⁴⁰⁾ reportaram um surto que ocorreu na Tailândia e cuja fonte de contaminação identificada foi um manipulador de alimentos que apresentava lesões numa das mãos.

Apesar de no presente estudo, os resultados terem sido 100% satisfatórios para o parâmetro contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo nos alimentos analisados, o facto de se ter observado presença deste grupo de bactérias em 4 (44%) dos manipuladores de 3 roulottes demonstra que estes profissionais apresentaram falta de higiene pessoal e/ou processos de manipulação inapropriados e que podem contaminar os alimentos. De salientar que durante a recolha das amostras apenas o manipulador da roulotte A teve a iniciativa de utilizar luvas, após rápida lavagem das mãos, e que nenhum dos outros manipuladores procedeu à lavagem/higienização das mãos antes da manipulação dos alimentos prontos-a-comer à venda. De facto, os alimentos adquiridos na roulotte A não se apresentaram contaminados com *Staphylococcus* coagulase positivo nem com o bioindicador *E. coli* e as cargas de aeróbios mesófilos e de *Enterobacteriaceae*/coliformes foram menores quando comparado com alimentos de algumas das outras roulottes. Alguns autores afirmam que o uso correto de luvas poderá contribuir positivamente para a melhoria da higiene das mãos, apesar de ser um tema controverso ^(15, 32). Ainda que o uso de luvas seja recomendado por entidades oficiais nos guias de boas práticas para determinadas atividades, não existe evidência de que o uso de luvas na preparação de alimentos seja o método mais seguro em comparação com procedimentos eficazes de lavagem de mãos ⁽¹⁵⁾. Outro facto importante foca-se na correta

utilização das luvas por parte dos manipuladores de alimentos e que, sendo esta uma barreira física, é muitas vezes erradamente considerado que é suficiente para impedir o manipulador de contaminar os alimentos. Como tal, alguns autores argumentam que o uso de luvas obrigatório pode causar decréscimo no estado geral de higiene e que estas são comumente mal utilizadas ^(15, 74). Perez-Rodriguez *et al* ⁽³²⁾ defende mesmo que a humidade residual das luvas favorece a transferência de bactérias. Outros autores ^(75, 76) demonstram que se os manipuladores não lavarem as mãos antes de colocarem as luvas, tanto o interior como o exterior das luvas ficam contaminados consoante o estado higiénico das mãos destes ⁽¹⁵⁾. Para além desse facto, os microrganismos aderem à superfície das luvas tornando-se fontes viáveis de contaminação cruzada, tal como as mãos não lavadas, devendo assim ser trocadas frequentemente, uma vez que os microrganismos não serão removidos aquando da lavagem das luvas ⁽¹⁵⁾. Uma vez que as bactérias podem ser transferidas através das luvas para as mãos implica maior perigo, principalmente se o manipulador não proceder a lavagem das mãos antes de exercer a sua atividade e após descartar as luvas ⁽³²⁾. No caso de manipuladores de alimentos prontos-a-comer como os analisados neste estudo, a lavagem adequada das mãos em combinação com o uso correto de luvas poderia reduzir o risco de contaminações cruzadas das mãos aos alimentos, tal como sugerido por diversos autores ^(15, 74).

Adicionalmente, é de salientar que na Europa é obrigatório que o responsável de cada estabelecimento onde se manipulem alimentos tenha formação na área da higiene e segurança alimentar ⁽¹⁹⁾. No entanto, muitos manipuladores de alimentos continuam a apresentar falta de conhecimentos relativos a higiene pessoal (higiene das mãos, cuidados com o uniformes), higiene dos alimentos, correta higienização das superfícies e equipamentos, e cuidados para evitar contaminação cruzada. Sendo a “venda ambulante” um setor onde as condições das instalações e o ambiente circundante se encontram mais expostos a perigos ambientais, estando por isso mais suscetíveis a contaminações microbianas, a falta de formação dos manipuladores tem ainda mais peso no que se refere à prevenção e controlo das doenças transmitidas por alimentos. O trabalho descrito por Bezerra *et al* ⁽⁷⁷⁾ é um exemplo onde foi possível evidenciar uma relação entre o número de hamburgueres classificados como impróprios para consumo, os altos

níveis de contaminação microbiana dos manipuladores e a falta de formação destes.

4.4 Avaliação global das roulottes

No que diz respeito às 10 unidades móveis que serviram de objeto de estudo para este trabalho, verificamos que na globalidade nenhuma delas pode ser considerada “satisfatória” em termos de qualidade e segurança alimentar, pois nenhum dos alimentos/manipuladores proveniente destas foi classificado como “satisfatório” em todos os parâmetros analisados. Verificou-se que do total de roulottes analisadas, 60% (roulottes C, D, F, H, I e J), apresentavam-se “não satisfatórias” para o parâmetro *E. coli* nos manipuladores e/ou nos alimentos. Apesar deste parâmetro poder ser indicativo de maior possibilidade de encontrar microrganismos patogénicos de origem fecal ⁽⁷⁸⁾ não foi detetada a presença de *Salmonella* em nenhuma das unidades móveis analisadas. No entanto, verificamos que metade dos estabelecimentos visitados (n=5/10) apresentaram microrganismos com potencial impacto na saúde dos consumidores, tais como *Staphylococcus* coagulase positiva (roulottes C, G e I) nos manipuladores e/ou *Listeria monocytogenes* (roulottes C, D e J) nos alimentos, em valores considerados não satisfatórios e inaceitáveis, respetivamente.

Assim, é possível que os alimentos prontos-a-comer disponíveis para venda nestes estabelecimentos de venda ambulante possam constituir um perigo para o consumidor final. A deteção de *Staphylococcus* coagulase positivo nos 2 manipuladores da roulotte I e num manipulador da roulotte C e num da G sugere a presença de uma potencial fonte de contaminação para os alimentos disponíveis nessas unidades, apesar de neste estudo não terem sido detetados valores insatisfatórios nos alimentos. Relativamente a *L. monocytogenes*, apesar de não termos avaliado o papel dos manipuladores na disseminação desta bactéria dentro do estabelecimento (ex. por práticas de contaminação cruzada, entre alimentos crus e cozinhados ou entre alimentos e equipamentos/utensílios), a sua presença em alimentos prontos-a-comer em diversas roulottes sugere essa possibilidade. De facto, considerando alguns estudos há evidências de que os

manipuladores de alimentos têm um papel importante na contaminação e disseminação desta bactéria patogénica ⁽⁷⁹⁾. Adicionalmente, sendo uma bactéria ubíqua (solo, vegetais e água) é expectável a sua presença em alimentos de origem animal/vegetal crus ou em alimentos cujo processamento não conduz à destruição da bactéria, como os enchidos e produtos de salsicharia ⁽⁶⁶⁾. Adicionalmente, a presença desta bactéria no produto final (ex. alimentos pronto a comer) pode ocorrer no local de produção de alimentos, devido essencialmente à contaminação cruzada com outros produtos crus (ex. alimentos de origem animal ou vegetal) ou equipamentos/utensílios, ou ainda devido a uma manipulação inadequada (ex. má higienização dos manipuladores). Sendo os cachorros-quentes e os hamburgueres analisados neste estudo compostos por produtos cárneos e por produtos hortícolas crus refrigerados é possível que a contaminação com *L. monocytogenes* tenha tido origem nos próprios ingredientes, tal como sugerido por Barancelli *et al* ⁽⁶⁹⁾. Adicionalmente, sendo *L. monocytogenes* um microrganismo psicrófilo, a manutenção dos ingredientes destes alimentos prontos-a-comer sob refrigeração poderá ter permitido o crescimento desta bactéria e tornar mais complicado o seu controlo nestas unidades de venda ambulante ⁽⁶⁹⁾. Também noutra estudo com alimentos prontos a comer em 20 pontos de venda ambulante se verificou que em 30% dos estabelecimentos as práticas de manipulação e armazenamento dos alimentos e as condições de higiene foram consideradas inadequadas, sugerindo falta de conhecimentos básicos sobre manipulação e higiene dos alimentos, o que explica o facto destes alimentos poderem representar um problema de saúde pública ⁽¹⁶⁾.

5. Conclusões

Os alimentos prontos a comer provenientes das unidades móveis de restauração apresentaram uma má qualidade microbiológica, com presença de bactérias indicadoras de contaminação fecal como *E. coli*, mas principalmente por constituírem uma fonte potencial de bactérias patogénicas como *L. monocytogenes*. Relativamente aos manipuladores, o seu estado de higiene foi também considerado como não satisfatório, sendo um fator negativo para a produção adequada de alimentos, quer pela presença de *E.coli*, quer de *Staphylococcus* coagulase positivo, o que poderá comprometer a segurança dos alimentos fornecidos nessas unidades.

Estes resultados evidenciam níveis de contaminação consideráveis, não obstante a exigência de autorização prévia ou licença para o exercício desta atividade (conforme previsto no DL n.º 122/79 ⁽²³⁾ e nos Regulamentos Camarários aplicáveis aos municípios do Porto ⁽²⁴⁾ e de Vila Nova de Gaia ⁽²⁵⁾). Deste modo, podemos concluir que o controlo dos níveis de contaminação dos alimentos terá que passar por estratégias que estimulem a adoção de medidas preventivas e pró-ativas. Assim, seria relevante apostar na determinação e aplicação de requisitos pré-determinados relativos à higiene alimentar, que deveriam ser cumpridos nas unidades de venda ambulante. Por outro lado, e ainda como medida preventiva, seria pertinente criar um manual/código de boas práticas adaptado ao sector da venda ambulante, medida aliás prevista no DL n.º113/2006 ⁽²⁶⁾. Adicionalmente, deveria ainda ser promovida a formação e informação dos vendedores ambulantes, sensibilizando-os para a importância da adoção das boas práticas de higiene no exercício da sua atividade. De resto, o Regulamento (CE) N.º 852/2004 ⁽¹⁹⁾ dedica o seu Capítulo XII a esta matéria, sublinhando a importância da formação e da instrução dos vendedores. A nível mais reativo, as autoridades competentes nesta matéria deverão também reforçar os seus poderes de fiscalização e controlo, sancionando as condutas desviantes.

Em suma, a implementação conjunta de todas estas medidas preventivas e reativas poderá ter reflexos diretos na segurança dos alimentos e contribuirá para a diminuição dos níveis de contaminação e, conseqüentemente, para a diminuição da incidência das doenças de origem alimentar.

6. Referências Bibliográficas

1. FERCO. FERCO's Position Paper on Hygiene. 2001; Brussels. Disponível em: http://www.ferco-catering.org/pdf/food%20hygiene/hygiene_EN.pdf.
2. ARESP, A dimensão da restauração coletiva, Barómetro, 2006.
3. FERCO. Promoting healthy diets and physical activity: a European dimension for the prevention of overweight, obesity and chronic diseases. 2006; Brussels. Disponível em: http://www.ferco-catering.org/pdf/FERCO_Contribution_to_the_green_paper.pdf.
4. Marques HMAC. O sector alimentar e a caracterização do consumo alimentar fora de casa - Portugal: 1990-2000 – [Tese de Mestrado]. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação Universidade do Porto; 2009.
5. Baptista P e Linhares M. Higiene e segurança alimentar na restauração. Relatório não técnico, Volume I.
6. de Almeida ASP. A influência da família e da televisão na alimentação das crianças do 4ºano do concelho de Vila Nova de Gaia -[Tese de Mestrado]. Universidade Aberta; 2009.
7. Veiros MB. Qualidade na produção de refeições: segurança e apreciação sensorial – [Tese de Doutoramento]. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação: Universidade do Porto; 2008.
8. Mimoso J. As actividades de lazer nocturno na cidade do Porto e seus arredores: uma visão geográfica– [Tese de Mestrado]. Faculdade de Letras: Universidade do Porto; 1998.
9. Lues JF, Rasephei MR, Venter P, Theron MM. Assessing food safety and associated food handling practices in street food vending. *International Journal of Environmental Health Research*. 2006; 16(5):319-328.
10. Olsen NV, Sijtsema SJ, Hall G. Predicting consumers' intention to consume ready-to-eat meals. The role of moral attitude. *Appetite*. 2010; 55:534-539.
11. Amson GV. Comércio ambulante de alimentos em Curitiba: perfil de vendedores e propostas para programa de boas práticas higiênicas na manipulação de alimentos– [Tese de Mestrado]. Universidade Federal do Paraná, 2005.
12. Nicolas B, Abdoul B, Aly S, Amadou OC, Jules IA, Alfred T. Hygienic status assessment of dish washing waters, utensils, hands and pieces of money from street food processing sites in Ouagadougou (Burkina Faso). *African Journal of Biotechnology*. 2006; 5(11):1107-1112.
13. Curi, JDP. Condições microbiológicas de lanches (cachorro-quente) adquiridos de vendedores ambulantes, localizados na parte central da cidade de Limeira - SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
14. Rodrigues KL, Gomes JP, Conceição RCS, Brod CS, Carvalho, JB, Aleixo JAG. Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS. *Ciências e tecnologias de Alimentos*. Campinas. Set-Dez., 2003; 23(3):447-452.
15. Ayçiçek H, Aydoğan H, Kuçukkaraas A, Baysallar M, Basustaoglu AC. Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. *Food control*. 2004; 15:253-259.
16. Lucca A, Torres EAFS. Condições de higiene de “cachorro-quente” comercializado em vias públicas. *Revista Saúde Pública*. 2002; 36(3):350.
17. Codex Alimentarius. Recommended international code of practice general principles of food hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003.
18. Regulamento 178/2002. Regulamento (CE) N.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios.
19. Regulamento 852/2004. Regulamento (CE) N.º 852/2004 do parlamento europeu e do conselho de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios 54.

20. Vaz A, Moreira R, Hogg T. Introdução ao HACCP. Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica; Março 2000.
21. Comissão das Comunidades Europeias. Projecto de documento de orientação sobre a aplicação de procedimentos baseados nos princípios HACCP e sobre a simplificação da aplicação dos princípios HACCP em determinadas empresas do sector alimentar. Bruxelas: Jornal Oficial da União Europeia; 2005.
22. Food Safety Authority of Ireland. Guia para controlo da segurança alimentar em restaurantes europeus. Versão traduzida pelo Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge; 2006. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/AlimentacaoNutricao/GuiaControloSegurancaAlimentar.pdf>
23. DL 122/79. Decreto Lei n.º 122/79, de 08 maio, publicado no Diário da República, I Série, n.º 105, de 08 de maio de 1979, que regulamenta a venda ambulante.
24. Código Regulamentar do Município do Porto, Aviso n.º 13028/2012, de 28 de setembro de 2012.
25. Regulamento de vendedores ambulantes do município de Vila Nova de Gaia, da assembleia municipal da câmara de Vila Nova de Gaia, de 01 de janeiro de 2010.
26. DL 113/2006. Decreto-Lei n.º 113/2006, de 12 de junho, publicado no diário da república, I Série, de 12 de junho de 2006, que estabelece as regras de execução, na ordem jurídica nacional, dos Regulamentos (CE) n.os 852/2004 e 853/2004, do parlamento europeu e do conselho, de 29 de Abril, relativos à higiene dos géneros alimentícios e à higiene dos géneros alimentícios de origem animal, respectivamente.
27. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott, Harley, and Klein's, Microbiology. 7th edition, 2008.
28. Tauxe RV, Doyle MP, Kuchenmuller T, Schlundt J, Stein CE. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infection. *International Journal of food microbiology*. 2010; 139:S16-S28.
29. Baptista P and Linhares M. Higiene e segurança alimentar na restauração. Relatório não técnico, Volume II.
30. Soares E. Doenças de origem alimentar - Infeções e intoxicações. Administração regional de saúde de Lisboa e Vale do Tejo; 2007.
31. Veiga A, Lopes A, Carrilho E, Silva L, Dias MB, Seabra MJ, João M, Borges M, Fernandes P, Nunes S. Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. Autoridade de segurança alimentar e económica (ASAE). Lisboa; 2009.
32. Pérez-Rodríguez F, Valero A, Carrasco E, García RM^a, Zurera G. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2008; 19:131-144.
33. World Health Organization (WHO). Essential safety requirements for street-vended food. Unpublished document WHO/FNU/FOS 96.7 Revised edition, Geneva. 1996 Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/streetvend.pdf
34. Barro N, Razack BA, Yollande I, Aly S, Tidiane OCA, Philippe NA, Comlan DS, Sababenedjo TA. Street vended foods improvement: contamination mechanisms and application of food safety objective strategy: critical review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2007; 6(1):1-10.
35. Rane S. Street vended food in developing world: hazard analyses. *Indian Journal Microbiology*. 2011; 51(1):100–106.
36. Choudhury M, Mahanta LB, Goswami JS, Mazumder MD. Will capacity building training interventions given to street food vendors give us safer food? A cross-sectional study from India. *Food Control*. 2011; 22:1233-1239.
37. Hansen TB, Knochel S. Image analysis method for evaluation of specific and non-specific hand contamination. *Journal of Applied Microbiology*. 2003; 94(3):483-494.
38. Jariyawaranugoon U. Is hand washing important for the food industry? *University of the Thai Chamber of Commerce Journal*. 2007; 27(2):287-299.

39. Abreu ES, Medeiros FS, Santos DA. Análise microbiológica de manipuladores de alimentos do município de Santo André. São José dos Campos-SP. *Revista Uni Vap*. 2011; 17(30).
40. Wei HL, Chiou CS. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. *Epidemiology Infection Journal*. 2002; 128(1):15-20.
41. Gustafson DR, Vetter EA, Larson DR, Ilstrup DM. Effects of 4 hand-drying methods for removing bacteria from washed hands: A randomized Trial. *Mayo Clinic Proceedings*. 2000; 75:705-708.
42. ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for enumeration of microorganisms - Colony-Count technique at 30°C.
43. ISO 4832:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for enumeration of coliforms - Colony-Count technique.
44. ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*.
45. ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide.
46. AFNOR/NF BIO 12/20-12/06. 2010. *chromID™ Coli medium* agar - Chromogenic and selective medium designed for the enumeration of coliforms and β -Glucuronidase positive *E. coli* from food samples.
47. ISO 6888-1:1999; 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.
48. ISO 11290-1:2004. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* Part 1: Detection Method.
49. ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
50. ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
51. Wang R, Cao WW, Cerniglia C. PCR Detection and quantification of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62:1242-1247.
52. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66(10):4555-8.
53. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35(11):2819-25.
54. Mainar-Jaime RC, Andrés S, Vico JP, Garrido V, Grilló MJ. Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 standard method for detection of *Salmonella* spp. on mesenteric lymph nodes from slaughter pigs. 2012. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51:189-194.
55. Santos MI, Correia C, Cunha MIC, Saraiva MM, Novais MR. Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. INSA. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Centro de Segurança Alimentar e Nutrição. *Revista da ordem dos Farmacêuticos*. 2005; 64:66-68.
56. RM N° 461-2007/MINSA. Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas. 07 de Junio del 2007. Disponível em: http://www.saludarequipa.gob.pe/desa/archivos/Normas_Legales/alimentos/RM_461_2007.pdf
57. Rall VLM, Sforcin, JM, Augustini VCM, Watanabe MT, Fernandes Jr. A, Rall R, Silva MG, Araújo Jr. JP. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated

from nasal cavities and hands of food handlers. *Brazilian Journal of Microbiology*.2010; 41:59-65.

58. Mello AG, Gama MP, Marin VA, Colares LGT. Conhecimento dos manipuladores de alimentos sobre boas práticas nos restaurantes públicos populares do Estado do Rio de Janeiro. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas. Jan./mar., 2010; 13(1):60-68.

59. Careli RT, Dias AS, Andrade N J, Antunes MA. Qualidade de água e condições higiênicas de manipuladores, equipamentos e utensílios em micro-indústrias de laticínios. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. Juiz de Fora. Jul./Ago. 2003; 58(333):85-88.

60. HPA. Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market. London: Health Protection Agency. 2009.

61. Montville TJ, Matthews KR and Kniel KE. Food Microbiology an introduction. 3rd edition. 2013.

62. Food safety is everybody's business. Your guide to preventing foodborne illness. Washington State Food & Beverage Workers' Manual. DOH Pub 332-036. April 2005.

63. APHORT .Código de boas práticas de higiene e segurança alimentar. Aplicação dos princípios de HACCP para hotelaria e restauração. Edição Outubro 2008.

64. Hoffman PN, Cooke EM, McCarville MR, Emmerson AM. Micro-organisms isolated from skin under wedding rings worn by hospital staff. *British Medical Journal (Clinical Research Ed)*. 1985; 290(6463):206-207.

65. Trick WE, Vernon MO, Hayes RA, Nathan C, Rice TW, Peterson BJ, et al. Impact of ring wearing on hand contamination and comparison of hand hygiene agents in a hospital. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36(11):1383-1390.

66. G1RS. Hambúrgueres de lanchonete de Porto Alegre estavam contaminados. 03/01/2012. Disponível em: <http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/2012/02/hamburgueres-de-lanchonete-de-porto-alegre-estavam-contaminados.html>.

67. Aragon-Alegro LC, Konta EM, Suzuki K, Silva MG, Júnior AF, Rall R, Rall VML. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. *Food Control*. 2007; 18:630–634.

68. Cruz CD, Martinez MB, Destro MT. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. 2008; 19(2):195-206.

69. Barancelli GV, Silva-Cruz, JV, Porto E, Oliveira CAF. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo. Jan./mar., 2011; 78(1)155-168.

70. Campos JAA. Saladas prontas a comer, veículos de bactérias e de genes de resistência a antibióticos clinicamente relevantes – [Tese de Mestrado] Faculdade de Farmácia: Universidade do Porto; 2012.

71. Tompkin RB. Environmental sampling – A tool to verify the effectiveness of preventive hygiene measures. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 2004; 95:45-51.

72. Vandenberg MF, Yzerman EP, Van Belkum A, Boelens HA, Sijmons M, Verbrugh HA. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *Journal Clinic Microbiology*. 1999; 37(10), 3133-3140.

73. Cruz AG, Louza BJG, Corno CN, Fernandez-Ferreira E, Teixeira FM, Santos GO, Souza MAL, Martins OR, Tavares RS, Teixeira RC. A questão da higiene de manipuladores das lanchonetes localizadas ao redor do campus do CEFET/Química de Nilópolis, RJ. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. Rio de Janeiro, 2003; 62(3):245-248.

74. Montville R, Chen Y, Schaffner DW. Glove barriers to bacterial cross-contamination between hands to food. *Journal Food Protection*. 2001; 64(6):845-849.

75. Pether JV, Gilbert RJ. The survival of salmonellas on finger-tips and transfer of the organisms to food. *Journal of Hygiene Cambridge*. 1971; 69, 673-681.

76. Paulson DS. To glove or to wash: a current controversy. *Food Quality*. June/July, 1996; June/July, 60-64.
77. Bezerra ACD, Reis RB, M. BDH. Microbiological quality of hamburgers sold in the streets of Cuiabá - MT, Brazil and vendor hygiene awareness. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2010; 30(2):520-524.
78. de Sousa, CP. The impact of food manufacturing practices on food borne diseases. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. July/Aug., 2008; 51(4):815-823.
79. Montville R, Chen Y, Schaffner DW. Risk assessment of hand washing efficacy using literature and experimental data. *International Journal of Food Microbiology*. 2002; 73:305-313.
80. Pritchett LC, Konkel ME, Gay JM, Besser TE. Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolates by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38(9): 3484-8.

Anexos

Índice de Tabelas

Tabela 1: Descrição e sequências nucleotídicas dos *primers*, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado para as diferentes reações de PCR usados para *Escherichia coli*.

Tabela 2: Descrição e sequências nucleotídicas dos *primers*, reagentes, condições de amplificação, marcadores e tamanho do produto esperado para as diferentes reações de PCR usados para *Salmonella*.

Anexo A

Tabela 1: Descrição e sequências nucleotídicas dos *primers*, condições de amplificação e tamanho do produto esperado para as diferentes reações de PCR usados para *E. coli*.

Objetivo	Primers (Sequência 5' - 3')	Aplicação	Referência	Reagentes	Condições de Amplificação	Tamanho do produto (bp)
Identificação da espécie <i>E. coli</i> por 16S rDNA	Eco 1 GACCTCGGTTTAGTTCACAGA Eco 2 CACACGCTGACGCTGACCA	16S rDNA	(Wang R <i>et al</i> , 1996)	Tampão 1x; 1,5 mM de MgCl ₂ ; 200 µM de cada dNTP; Primer 0,2 µM de cada; Go Taq® DNA Polymerase 0,5U (Promega) e 2 µl de DNA	95°C - 10 minutos (1 ciclo); 94°C - 30 segundos, 55°C - 1 minuto, 72°C - 2 minutos (30 ciclos); 72°C - 10 minutos (1 ciclo)	ECO - 585bp
Pesquisa dos grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	ChuA.1 GACGAACCAACGGTCAGGAT ChuA.2 TGCCGCCAGTACCAAAGACA YjaA.1 TGAAGTGTCAGGAGACGCTG YjaA.2 ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC TspE4C2.1 GAGTAATGTCGGGGCATTCA TspE4C2.2 CGCGCCAACAAAGTATTACG	<i>chuA</i> <i>yjaA</i> TspE4C2	(Clermont <i>et al</i> , 2000)	Tampão 1x; 1,5 mM de MgCl ₂ ; 200 µM de cada dNTP; Primer 0,2 µM de cada; Go Taq® DNA Polymerase 0,5U (Promega) e 2 µl de DNA	94°C - 10 minutos (1 ciclo); 94°C - 45 segundos, 55°C - 45 segundos, 72°C - 1 minuto (30 ciclos); 72°C - 10 minutos (1 ciclo)	<i>chuA</i> - 279 <i>yjaA</i> - 211 TspE4C2 - 152

Tabela 2: Descrição e sequências nucleotídicas dos *primers*, reagentes, condições de amplificação, marcadores e tamanho do produto esperado para as diferentes reações de PCR usados para *Salmonella*.

Objetivo	Primers (Sequência 5´ - 3´)	Aplicação	Referência	Reagentes	Condições de Amplificação	Tamanho do produto (bp)
Identificação de <i>Salmonella</i>	InvA 1 ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT InvA 2 AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	<i>invA</i>	(Pritchett L <i>et al</i> , 2000)	Tampão 1x; 1,5 mM de MgCl ₂ ; 200 µM de cada dNTP; Primer 0,2 µM de cada; Go Taq® DNA Polymerase 0,5U (Promega) e 2 µl de DNA	96°C - 1 minutos (1 ciclo); 96°C - 30 segundos, 60°C – 30 segundos, 72°C – 35 segundos (30 ciclos); 72°C - 10 minutos (1 ciclo)	<i>invA</i> - 243