



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera

HIGIENE DE EMBALAGENS DE PRODUTOS HORTOFRUTÍCOLAS, COMPARAÇÃO ENTRE EMBALAGENS DE MADEIRA E DE PLÁSTICO

Ana Isabel de Carvalho Abrantes

Dissertação apresentada na Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova
de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando

Co-Orientadora: Professora Doutora Benilde Mendes

**Monte de Caparica
2008**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho. Nomeadamente:

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Benilde Mendes e Professora Doutora Ana Luísa Fernando, as quais, para além de me terem permitido esta oportunidade, me deram todo o apoio e facilidades sem as quais me teria sido muito difícil concluir esta dissertação;

À Eng^a Filipa Pico, da EMBAR, por toda a disponibilidade e auxílio nas colheitas, bem como pela informação prestada, essencial na elaboração deste trabalho e à própria EMBAR, pela oportunidade de realização deste trabalho;

À Miryam Díez Garcia, por todo o suporte na realização do trabalho prático, bem como pela sua excelente companhia;

Ao MARL, por terem apoiado a realização das colheitas nos seus diversos pavilhões, e também por terem compreendido a importância do trabalho proposto;

A todos os colaboradores do Grupo de Disciplinas da Ecologia da Hidrosfera, por todo o apoio dispensado durante o trabalho laboratorial;

Às D. Lurdes, D. Rosa e D. Rita, as quais sempre se mostraram disponíveis no auxílio ao longo de todo o trabalho, bem como pela sua simpatia;

Aos meus Responsáveis de Equipa e Coordenadores, bem como alguns colegas, os quais me facilitaram sempre ao nível do horário de trabalho para que me fosse possível realizar a parte prática deste mestrado;

Por fim, agradeço a todos os meus amigos e familiares pelo apoio e compreensão que evidenciaram durante a escrita da dissertação.

Resumo

No acondicionamento de produtos hortofrutícolas, o material mais utilizado tradicionalmente era a madeira. No entanto, actualmente, a tendência tem sido a sua substituição por caixas de plástico. Os argumentos apresentados relacionam-se com o facto das embalagens de plástico serem mais duradouras, poderem ocupar menos espaço quando vazias, pois podem ser encastráveis ou rebatidas, e, sobretudo, devido ao facto do plástico ser um material considerado mais higiénico e de mais fácil limpeza do que a madeira.

Face a esta situação, o objectivo deste trabalho foi o de determinar se a madeira é na realidade um material menos higiénico, em termos de contaminação microbiana (bactérias, bolores e leveduras), do que o seu principal competidor, o plástico. Para avaliar, do ponto de vista do factor higiene, as embalagens de madeira e as embalagens de plástico, programaram-se três ensaios. No primeiro ensaio (Ensaio 1), pretendeu-se estudar e comparar a contaminação microbiana verificada em embalagens de madeira e de plástico. Neste caso, caracterizaram-se, em termos de contaminação microbiana, as embalagens de madeira e de plástico utilizadas no transporte e comercialização de produtos hortofrutícolas. As amostras foram recolhidas no MARL (Mercado Abastecedor da Região de Lisboa), local onde estes dois tipos de embalagens são comumente utilizados. No segundo ensaio (Ensaio 2), pretendeu-se avaliar a susceptibilidade de cada um dos materiais (madeira e plástico) à contaminação do ambiente circundante a que estão sujeitas as caixas durante o transporte, armazenamento e comercialização de produtos hortofrutícolas. Para esse efeito, foi estudada a evolução da contaminação microbiana dos materiais em estudo, madeira e plástico, em diferentes condições ambientais, durante um período de três meses. No terceiro ensaio (Ensaio 3), pretendeu-se estudar a evolução da sobrevivência de bolores e leveduras e de *Bacillus cereus* (organismos habitualmente detectados em produtos hortofrutícolas e que podem contaminar as embalagens) em embalagens de madeira e de plástico, contaminados com culturas destes microrganismos, em diferentes condições de humidade e temperatura. Este ensaio teve como principal finalidade verificar se existem diferenças entre os materiais (madeira e plástico) em termos da manutenção e crescimento da contaminação com bolores e leveduras e com *B. cereus*.

De acordo com os resultados obtidos no Ensaio 1 pode concluir-se que em termos de contaminação microbiana, não existem diferenças significativas entre as caixas de madeira e as caixas de plástico. Verificaram-se, no entanto, diferenças significativas entre embalagens contendo frutos e embalagens contendo produtos hortícolas. Com efeito, as embalagens contendo produtos hortícolas apresentaram uma enumeração de bolores e leveduras e de bactérias coliformes significativamente superior à observada nas embalagens contendo frutos. De acordo com os resultados obtidos neste ensaio e de acordo com as observações efectuadas no local da amostragem, pode também concluir-

se que a contaminação microbiana elevada, verificada em algumas caixas de madeira e de plástico, é resultado da falta de limpeza das caixas antes da sua reutilização.

A análise dos resultados obtidos no Ensaio 2 mostrou também que os materiais de madeira apresentaram um comportamento semelhante aos dos materiais de plástico. Efectivamente, nas diversas condições experimentais estudadas neste ensaio, não se verificou que a madeira possa ser mais susceptível à contaminação do ambiente circundante do que o plástico.

De acordo com os resultados obtidos no Ensaio 3, verificou-se que os materiais de madeira possibilitam o crescimento e desenvolvimento de bolores e leveduras, não se verificando o mesmo nos materiais de plástico. Por outro lado, verificou-se que os materiais de plástico, à temperatura de 20°C, possibilitam um maior crescimento e desenvolvimento de *B. cereus* do que os materiais de madeira.

Abstract

Wood has been a traditional material for fruits and vegetables packaging. However, currently, the trend has been its substitution for plastic boxes. The presented arguments are related with the fact that plastic packings are more lasting, are able to occupy less space when empty, and, above all, due to the fact that plastic is considered a more hygienic material and easier to clean than wood.

So, the aim of this work was to determine if wood is really a less hygienic material than plastic, in terms of microbial contamination. To evaluate, from the hygiene point of view, wood and plastic packaging, three assays had been programmed. In the first assay (Assay 1), it was intended to study and to compare the microbial contamination on wooden and plastic materials. In this case, wooden and plastic packing, used for the transport and commercialization of fresh fruits and vegetables were characterized in terms of its microbial contamination. The samples had been collected in the MARL (Supplying Market for the Region of Lisbon), place where both types of packaging are commonly used. In the second assay (Assay 2), the susceptibility of each one of the materials (wood and plastic) to the contamination of the surrounding environment was evaluated. In this study, the evolution of the microbial contamination of both materials, wood and plastic, was followed in different environmental conditions, similar to those during the transport, the storage and the commercialization of fruits and vegetables, along a period of three months. In the third assay (Assay 3), materials were contaminated with cultures of moulds and yeasts, microorganisms that are usually detected in horticultural products, which can contaminate packings, and incubated at different conditions of temperature and moisture. The evolution of moulds and yeasts, in wood and plastic materials, was studied, in order to verify if there were any differences between the materials (wood and plastic), in terms of the maintenance and growth of the contamination with moulds and yeasts. Parallel, the same assay was performed with materials contaminated with a culture of *Bacillus cereus*, also a bacteria that is usually detected in horticultural products, which can contaminate packings.

The results obtained in the first assay, lead to the conclusion that there are no significant differences between wood and plastic packings, in terms of microbial contamination. However, there were found significant differences between packings containing fruit and packings containing vegetables. Packings containing vegetables presented higher moulds, yeasts and coliforms counts than the ones containing fruits. Observations and results also permit to conclude that high microbial counts obtained in some packings were due not to the type of material, wood or plastic, but due to the lack of cleaning and sanitizing treatments prior to use.

According to results obtained in Assay 2, both materials, wood and plastic, presented similar behavior. At different experimental conditions, studied in this assay, it was

possible to conclude that wood is not more susceptible to the surrounding contamination than plastic.

In Assay 3, the growth and development of moulds and yeasts was enhanced in wood, but not in plastic. On the other hand, plastic materials, at 20°C, enhanced higher growth and development of *B. cereus* than wood materials.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iv
Índice	vi
Índice de Figuras	vii
Índice de Quadros	ix
Simbologia e Notações	x
1. Introdução	1
2. Embalagens Alimentares	2
2.1. Embalagens de Frutas e Hortaliças	2
2.1.1. Embalagens de Madeira.....	6
2.1.2. Embalagens de Plástico	8
2.2 Higiene das Embalagens de Hortofrutícolas.....	11
3. Materiais, Métodos e Ensaios	22
3.1. Ensaio 1.....	22
3.1.1. Métodos	23
3.1.2. Análise estatística.....	27
3.2. Ensaio 2.....	28
3.3. Ensaio 3.....	29
4. Apresentação e Discussão de Resultados	31
4.1 Ensaio 1	31
4.2 Ensaio 2	41
4.3 Ensaio 3	54
4.3.1 Contaminação com Bolores e Leveduras	54
4.3.2 Contaminação com <i>Bacillus cereus</i>	59
5. Conclusão	65
6. Bibliografia.....	67

Índice de Figuras

Figura 2.1: Caixa de madeira contendo pêras.....	4
Figura 2.2: Caixa de cartão contendo mangas.....	4
Figura 2.3: Caixas de plástico contendo pêras.	5
Figura 2.4: Tabuleiros expandidos de poliestireno envolvidos com filmes de plástico extensível, à venda no supermercado.	5
Figura 2.5: Sacos de rede contendo alho e cebolas.	6
Figura 2.6: Paletes de madeira, após montagem e antes de serem montadas (de cima para baixo).....	7
Figura 2.7: Caixas de madeira agrafada, pregada e entrançada.....	8
Figura 2.8: Caixa de plástico.	8
Figura 2.9: Estrutura química do polietileno.	9
Figura 2.10: Estrutura química do polipropileno.....	10
Figura 2.11: Estrutura química do poli(tereftalato de etileno).	11
Figura 2.12: Caixas plásticas empilháveis e encastráveis	10
Figura 2.13: Caixa plástica com aditivo Microban®	10
Figura 2.14: Caixa plástica de PET com tampa.	11
Figura 2.15: Representação esquemática de uma cadeia de abastecimento genérica de produtos hortofrutícolas exportados.	13
Figura 2.16: Perigos biológicos, físicos e químicos.	14
Figura 2.17: Símbolo que identifica materiais de grau alimentar.....	19
Figura 2.18: Exemplos de mau acondicionamento de embalagens.	19
Figura 3.1: Colheita de amostras no MARL, no dia 23/01/2008, em embalagens de madeira contendo alfaces e pêras.	23
Figura 4.1: Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.	32
Figura 4.2: Contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.	34
Figura 4.3: Contagem de bactérias coliformes (log NMP/cm ²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.	37
Figura 4.4: Contagem de enterococos, <i>C. perfringens</i> , <i>Pseudomonas</i> (log NMP/cm ²) e <i>B. cereus</i> (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.....	39
Figura 4.5: Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.....	41
Figura 4.6: Contagem de microrganismos totais viáveis a 36°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.....	43
Figura 4.7: Comparação da contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses.....	44
Figura 4.8: Comparação da contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses.	45

Figura 4.9: Contagem de enterococos (log NMP/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.	48
Figura 4.10: Contagem de <i>C. perfringens</i> (log NMP/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.	49
Figura 4.11: Contagem de <i>Pseudomonas</i> (log NMP/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.	50
Figura 4.12: Comparação entre madeiras de diferentes proveniências, em termos de contagem de <i>B. cereus</i> (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses.	53
Figura 4.13: Evolução da contaminação com bolores e leveduras nos materiais em estudo a 7°C, ao longo do tempo.	55
Figura 4.14: Evolução da contaminação com bolores e leveduras nos materiais em estudo a 20°C, ao longo do tempo.	56
Figura 4.15: Comparação da evolução da contaminação com bolores e leveduras nos materiais em estudo a diferentes temperaturas.	56
Figura 4.16: Comparação da evolução da contaminação com bolores e leveduras nas madeiras em estudo com diferentes percentagens de humidade.	57
Figura 4.17: Comparação da evolução da contaminação com bolores e leveduras nas madeiras provenientes de três diferentes regiões de Portugal.	58
Figura 4.18: Comparação da evolução da contaminação com bolores e leveduras nos diferentes tipos de plástico (PP e PEAD).	58
Figura 4.19: Evolução da contaminação com <i>Bacillus cereus</i> nos materiais em estudo a 7°C, ao longo do tempo.	60
Figura 4.20: Evolução da contaminação com <i>Bacillus cereus</i> nos materiais em estudo a 20°C, ao longo do tempo.	61
Figura 4.21: Crescimento de bolores e leveduras em madeiras inoculadas com <i>B. cereus</i>	61
Figura 4.22: Comparação da evolução da contaminação com <i>Bacillus cereus</i> nos materiais em estudo a diferentes temperaturas.	62
Figura 4.23: Comparação da evolução da contaminação com <i>Bacillus cereus</i> nas madeiras em estudo com diferentes percentagens de humidade.	62
Figura 4.24: Comparação da evolução da contaminação com <i>Bacillus cereus</i> nas madeiras provenientes de três diferentes regiões de Portugal.	63
Figura 4.25: Comparação da evolução da contaminação com <i>Bacillus cereus</i> nos diferentes tipos de plástico (PP e PEAD).	64

Índice de Quadros

Quadro 2.1: Exemplos de perigos físicos em alimentos.....	14
Quadro 4.1: Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.	31
Quadro 4.2: Contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.	33
Quadro 4.3: Contagem de bactérias coliformes e <i>E. coli</i> (log NMP/cm ²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.....	36
Quadro 4.4: Contagem de enterococos, <i>C. perfringens</i> , <i>Pseudomonas</i> (log NMP/cm ²) e <i>B. cereus</i> (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.....	38
Quadro 4.5: Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.....	41
Quadro 4.6: Contagem de microrganismos totais viáveis a 36°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.....	42
Quadro 4.7: Contagem de bolores e leveduras a 25°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.....	44
Quadro 4.8: Contagem de bolores e leveduras a 37°C (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.....	45
Quadro 4.9: Contagem de bactérias coliformes (log NMP/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.	47
Quadro 4.10: Contagem de Enterococos (log NMP/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.	48
Quadro 4.11: Contagem de <i>C. perfringens</i> (log NMP/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.	49
Quadro 4.12: Contagem de <i>Pseudomonas</i> (log NMP/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.	50
Quadro 4.13: Contagem de <i>B. cereus</i> (log ufc/cm ²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.	52
Quadro 4.14: Evolução da Contaminação com bolores e leveduras nos materiais em estudo, ao longo do tempo, no ensaio efectuado a 7°C (log ufc/cm ²).	54
Quadro 4.15: Evolução da Contaminação com bolores e leveduras nos materiais em estudo, ao longo do tempo, no ensaio efectuado a 20°C (log ufc/cm ²)	55
Quadro 4.16: Evolução da Contaminação com <i>Bacillus cereus</i> nos materiais em estudo, ao longo do tempo, no ensaio efectuado a 7°C (log ufc/cm ²).....	59
Quadro 4.17: Evolução da Contaminação com <i>Bacillus cereus</i> nos materiais em estudo, ao longo do tempo, no ensaio efectuado a 20°C (log ufc/cm ²).....	60

Simbologia e Notações

BPA	Boas Práticas Agrícolas
BPF	Boas Práticas de Fabrico
EMBAR	Associação Nacional de Recuperação e Reciclagem de Resíduos de Embalagens de Madeira
EN	“European Norm”, Norma Europeia
FAO	“Food and Agriculture Organization”
FCT-UNL	Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
FDA	“Food and Drug Administration”
GDEH	Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera
%H	Percentagem de humidade
ISO	“International Organization for Standardization”
MARL	Mercado Abastecedor da Região de Lisboa
NMP	Número mais provável
NP	Norma Portuguesa
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/World Health Organization
<i>P</i>	Probabilidade
PEAD	Polietileno de alta densidade
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PP	Polipropileno
ufc	Unidades formadoras de colónias

1. Introdução

A madeira tem sido um material tradicionalmente utilizado em diversas aplicações relacionadas com a indústria alimentar, nomeadamente na preparação, embalagem e transporte de produtos alimentares. No entanto, actualmente a tendência tem sido a utilização do plástico em substituição da madeira. Os argumentos apresentados relacionam-se com o facto da madeira ser menos higiénica, ser um material poroso, possibilitar o risco de lascas e ainda com a existência de deficientes métodos de limpeza e higienização (Revol-Junelles *et al*, 2005). Contudo, ainda está em discussão se a madeira é mais ou menos higiénica do que o plástico, uma vez que a exclusão do uso da madeira na indústria alimentar, tem sido baseada mais em meras suposições do que propriamente em dados científicos (Revol-Junelles *et al*, 2005).

Neste contexto, o presente trabalho pretende contribuir para o estudo da utilização das embalagens de madeira *versus* embalagens de plástico, sob o ponto de vista do factor higiene. Esta intenção surgiu na sequência do protocolo estabelecido entre a EMBAR (Associação Nacional de Recuperação e Reciclagem de Resíduos de Embalagens de Madeira) e o Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera (GDEH), da FCT-UNL. Este protocolo tem como principal finalidade dar suporte, em termos científicos, a algumas questões suscitadas por esta associação e seus respectivos associados.

Para avaliar, do ponto de vista do factor higiene, as embalagens de madeira e as embalagens de plástico programaram-se três ensaios. No primeiro ensaio, tentou-se estudar e comparar a contaminação microbiana verificada em embalagens de madeira e de plástico. Neste caso, caracterizaram-se em termos de contaminação microbiana as embalagens, de madeira e de plástico, utilizadas no transporte e comercialização de produtos hortofrutícolas. As amostras foram recolhidas no MARL (Mercado Abastecedor da Região de Lisboa), local onde estes dois tipos de embalagens são comumente utilizados. No segundo ensaio, foi estudada a evolução da flora microbiana existente em embalagens, quer de madeira, quer de plástico, ao longo do tempo, sob diferentes condições de temperatura e humidade, que pretendem simular as condições de transporte, armazenamento e comercialização a que as embalagens de produtos hortofrutícolas estão habitualmente sujeitas. No terceiro ensaio, pretendeu-se estudar a evolução da sobrevivência de bolores e leveduras e de *Bacillus cereus* (organismos habitualmente detectados em produtos hortofrutícolas) em embalagens de madeira e de plástico, contaminados com culturas destes microrganismos, em diferentes condições de humidade e temperatura.

2. Embalagens Alimentares

A embalagem, nas suas diversas formas, encontra-se sempre presente no manuseamento e acondicionamento de produtos alimentares, incluindo os produtos hortofrutícolas.

A embalagem desempenha diversas funções, que podem ser agrupadas em duas categorias (Almeida, 2005; DL 366-A/97; DL 560/99):

1. Funções Técnicas, relacionadas com a protecção, transporte, armazenamento, utilização e eliminação de produtos;
2. Funções de comunicação, relacionadas com a venda, informação ao consumidor, identificação do produto, atracção visual.

No contexto do manuseamento e acondicionamento de produtos alimentares, as duas principais funções técnicas da embalagem são (Almeida, 2005; DL 366-A/97):

1. Reunião dos produtos em unidades convenientes para o manuseamento;
2. Protecção dos produtos durante o transporte, armazenamento e comercialização.

Sob o ponto de vista logístico, consideram-se três categorias de embalagem (Almeida, 2005; DL 366-A/97):

- Unidade de Consumo (também designada por embalagem de venda ou embalagem primária). É aquela que está em contacto directo com o produto e se destina a ser adquirida pelo consumidor num ponto de venda a retalho.
- Unidade Comercial (embalagem secundária). É uma embalagem que agrupa diversas unidades de consumo. Esta embalagem é concebida para facilitar o manuseamento, armazenamento, preparação de encomendas e expedição, não se destinando à venda a retalho.
- Unidade Logística (embalagem terciária ou de transporte), frequentemente uma palete, sendo concebida para agrupar várias unidades durante a expedição.

2.1. Embalagens de Frutas e Hortalças

O sucesso da embalagem depende da forma como cumpre os requisitos de protecção e acondicionamento do produto ao longo de toda a cadeia desde a produção até à sua utilização final (Poças e Oliveira, 2001).

Os frutos e legumes são produtos com elevado teor em água e diversificados em termos de morfologia, de composição e de fisiologia. As principais causas de deterioração destes produtos são alterações metabólicas, danos mecânicos e ataques por pragas e doenças. A taxa de perda de qualidade do produto depende de factores ambientais como a temperatura, a humidade relativa, a composição atmosférica e a exposição à luz. A

gestão da temperatura ao longo da cadeia de distribuição é um dos parâmetros mais críticos (Poças e Oliveira, 2001).

Como tal, um determinado produto hortofrutícola pode ser acondicionado satisfatoriamente em diversos tipos de embalagens. Se forem tomados em conta somente os critérios técnicos, poderá optar-se por diversas embalagens dependendo de vários factores. Entre estes, para além das já referidas condições ambientais, encontram-se as características da cadeia logística, métodos de manuseamento e transporte, custo e disponibilidade dos materiais (Almeida, 2005).

Sob o ponto de vista de operações e manuseamento, consideram-se os seguintes tipos de contentores (Almeida, 2005):

- Contentores de colheita;
- Contentores de transporte;
- Contentores de armazenamento;
- Embalagens de venda.

Contudo, independentemente doutras considerações, existem requisitos fundamentais, aos quais as embalagens de produtos hortofrutícolas devem obedecer. No caso das embalagens a granel (objecto de estudo do trabalho) estas devem cumprir os seguintes requisitos (Almeida, 2005):

- Possuir resistência mecânica suficiente para proteger o conteúdo durante o manuseamento, transporte e enquanto estiverem empilhadas;
- A resistência mecânica da embalagem não deve sofrer alterações apreciáveis devido ao teor de humidade (molhada ou em atmosfera com elevada humidade relativa);
- A embalagem deve estabilizar e imobilizar os produtos, evitando o seu movimento dentro da embalagem durante o manuseamento e transporte;
- Não conter substâncias químicas que possam migrar para os produtos, contaminar ou serem tóxicos para o produto ou para os seres humanos;
- Cumprir exigências de manuseamento e de comercialização, em termos de peso, tamanho e forma;
- Fornecer segurança ao conteúdo;
- Identificar o conteúdo, auxiliar a apresentação do produto no ponto de venda, através de informação completa e correcta na etiqueta;
- Facilitar a eliminação, reutilização ou reciclagem;
- Ser económica, em relação aos benefícios.

Tradicionalmente, o material mais utilizado na embalagem a granel de frutas e hortaliças frescas era a madeira (figura 2.1). De acordo com os produtores deste tipo de material, a madeira comporta uma série de propriedades favoráveis, nas quais se inclui o

facto de ser um material de origem natural, que permite a manutenção das qualidades do produto e que realça a beleza do produto ^[1].



Figura 2.1: Caixa de madeira contendo pêras.

O cartão, que entrou em cena na década de 70 no transporte de hortaliças, teria algumas desvantagens comparativas: elevada capacidade de absorção de humidade e reduzida capacidade de transmissão de calor (figura 2.2). Assim, uma continuada investigação tecnológica de vanguarda conduziu ao cartão ondulado ou ao compacto, os quais, melhorados com o passar do tempo, permitiram incrementar o uso deste material para o acondicionamento de alimentos, e concretamente de produtos hortofrutícolas também. Ao alcançar este objectivo, as vantagens de preço, peso, facilidade de aprovisionamento, maior espaço útil para a publicidade do comerciante e do produto e menor custo de produção (pelo menos, inicialmente) determinaram que o cartão, na década de 90, se apresentasse como alternativa à madeira afectando a sua posição predominante (domínio absoluto nos anos 70) ^[1].



Figura 2.2: Caixa de cartão contendo mangas.

Durante o período de competição entre a madeira e o cartão surgem no mercado também diferentes sistemas de caixas de plástico (figura 2.3). Estas caixas são geralmente de polipropileno (PP) ou polietileno de alta densidade (PEAD).



Figura 2.3: Caixas de plástico contendo pêras.

Actualmente, são usados outros materiais para embalagens de produtos hortofrutícolas, na sua comercialização e transporte, para além dos já mencionados. Entre estes, incluem-se tabuleiros expandidos de poliestireno envolvidos com filmes de plástico extensível (figura 2.4), sacos de papel ou de plástico, tabuleiros de PVC, caixas de poli(tereftalato de etileno) (PET), etc (Camelo, 2004). Normalmente, cebolas, alhos e batatas são comercializados em sacos de rede, a qual pode ser de fibra natural ou sintética (figura 2.5). Estas embalagens podem funcionar como unidade de venda ou para acondicionar os produtos que são comercializados a granel.



Figura 2.4: Tabuleiros expandidos de poliestireno envolvidos com filmes de plástico extensível, à venda no supermercado.



Figura 2.5: Sacos de rede contendo alho e cebolas.

2.1.1. Embalagens de Madeira

A madeira tem sido um material vulgarmente utilizado na indústria alimentar, no transporte, embalagem e preparação dos alimentos.

A madeira pode ser encontrada em vários materiais envolvidos na preparação dos alimentos, quer seja nas nossas cozinhas, quer em restaurantes, quer mesmo em indústrias alimentares. Vários exemplos são as bancadas de trabalho, prateleiras, pranchas de corte e diversos utensílios (colheres de pau, espátulas, etc). Alguns utensílios podem ser parcialmente feitos de madeira, como por exemplo, as pegas de frigideiras, cabos de facas, etc. (Koch *et al*, 2002; Guðbjörnsdottir *et al*, 2002)

Contudo, existem ainda alimentos, que já se encontram preparados e prontos a consumir, se encontram em pleno contacto com a madeira, entre os quais se pode mencionar os gelados, cujos paus que os suportam são feitos de madeira. (Guðbjörnsdottir *et al*, 2002)

Para a embalagem de produtos hortofrutícolas, a madeira pode ser utilizada nos três tipos de embalagem referidos anteriormente, primária (ou de consumo), secundária (ou comercial) e terciária (ou logística).

As paletes de madeira (figura 2.6), são as embalagens terciárias mais usuais, embora também existam no mercado paletes de fibra de cartão ou de plástico. Estas paletes estão associadas ao sector da logística, facilitando o transporte e manuseamento das embalagens primárias e secundárias, do produtor ao consumidor.



Figura 2.6: Paletes de madeira, após montagem e antes de serem montadas (de cima para baixo). ^[2]

Por vezes, as embalagens primária e secundária confundem-se, no comércio de produtos hortofrutícolas. Neste tipo de embalagem, a madeira mais utilizada em Portugal é a de pinho, podendo para alguns produtos, como o morango, ser usada madeira de choupo (Pico, 2008). A caixa de madeira tem como principais vantagens, face a outros sistemas alternativos, a rigidez, a resistência ao empilhamento e à humidade (Poças e Oliveira, 2001). Contudo, o elevado peso, o espaço requerido para armazenamento (já que a maioria dos formatos são já pré-montados), a possibilidade de contaminação microbiológica e o facto de requerer operações manuais, são factores frequentemente apontados como desvantagens (Poças e Oliveira, 2001). Adicionalmente, requer a maioria das vezes forros de outro material, mais macio, para evitar danos do produto por abrasão, sendo todas estas razões apontadas como causas de um progressivo abandono da caixa de madeira em benefício das caixas de plástico ou em cartão canelado (Poças e Oliveira, 2001).

As embalagens de madeira podem ser classificadas segundo critérios variados. Este material pode ser trabalhado de diversas formas, podendo ser serrado, cortado ou desenrolado. Os elementos de ligação também podem constituir uma forma de classificação e nesse caso, teremos caixas pregadas, agrafadas, coladas, entrançadas ou armadas (Poças e Oliveira, 2001). Finalmente, as embalagens de madeira podem ser classificadas quanto à forma e quanto ao tamanho (Poças e Oliveira, 2001). A figura 2.7 apresenta algumas das embalagens de madeira tipicamente usadas para hortofrutícolas.



Figura 2.7: Caixas de madeira agrafada, pregada e entrançada.

As caixas pregadas são rígidas e bastante resistentes, sendo reutilizáveis. Os componentes têm uma espessura superior a 6mm e o espaçamento entre eles permite uma boa ventilação. Estas caixas são frequentemente usadas como caixa de colheita e simultaneamente de transporte (Poças e Oliveira, 2001). As caixas agrafadas ou coladas são caixas normalmente mais leves e menos resistentes, com componentes de espessura de 3 a 4 mm, não sendo reutilizáveis (Poças e Oliveira, 2001). Quanto mais elevada é a densidade da madeira, melhor é a sua resistência mecânica e melhor é a fixação dos elementos de ligação, como pregos ou agrafos (Poças e Oliveira, 2001). O ponto mais fraco da caixa é normalmente o elemento de ligação, por isso particular atenção deve ser dada a este aspecto (Poças e Oliveira, 2001). A madeira deve estar adequadamente seca para evitar fendas e crescimento de bolores durante a sua utilização (Poças e Oliveira, 2001).

2.1.2. Embalagens de Plástico

As caixas ou grades plásticas (figura 2.8) têm normalmente um preço superior ao das caixas de madeira ou de cartão canalado, mas pelo facto de terem uma duração maior, o seu custo inicial pode compensar (Poças e Oliveira, 2001).



Figura 2.8: Caixa de plástico.

Os materiais mais usados nas caixas de venda a granel são o PEAD ou o PP. O PEAD tem melhor resistência ao impacto e à luz, enquanto que o PP resiste melhor à abrasão (Poças e Oliveira, 2001).

O polietileno é um polímero de etileno (figura 2.9), podendo ter diferentes pesos moleculares, dependendo do tamanho da sua cadeia molecular, que é definido pelas condições de polimerização (temperatura, pressão e catalisadores), podendo obter-se uma variedade de resinas com diferentes densidades (Hui, 1992; Coles *et al*, 2003; Fernando, 2006). O polietileno de alta densidade é um polímero semicristalino (pode ter até 90% de cristalinidade) (Robertson, 2006). É um polímero termoplástico linear, apolar que apresenta densidades no intervalo de 941 a 965 kg/m³ (Robertson, 2006).

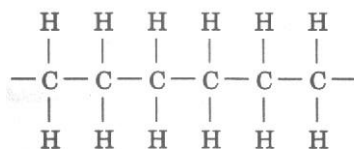


Figura 2.9: Estrutura química do polietileno.

O polietileno de alta densidade é uma excelente barreira à humidade, tem uma boa hermeticidade, é de fácil processamento e de baixo custo. Tem uma rigidez relativa, boa resistência física (à tracção e à perfuração ou impacto), térmica e química. Em geral, as suas características como força tensional, dureza, resistência térmica e de barreira a gases aumentam com o aumento da sua densidade, nunca sendo uma boa barreira a gases, é, no entanto, uma média barreira à gordura. É ainda um bom isolante, pois não é condutor de electricidade (Hui, 1992; Fernando, 2006). A resistência do PEAD à maioria dos químicos é grande, incluindo ácidos e bases diluídos, agentes oxidantes, hidrocarbonetos e alguns aldeídos/cetonas. As substâncias químicas de excepção são hidrocarbonetos clorados e aromáticos, que tendem a inchar e enfraquecer este polímero (Hui, 1992).

O polipropileno (PP) é um polímero de propileno (figura 2.10). Este polímero não cristalino apresenta uma densidade de cerca de 850 kg/m³ (Robertson, 2006). O polipropileno constitui uma boa barreira à humidade (melhor que o polietileno), mas uma fraca barreira a gases e gordura. Trata-se de um plástico de boa soldadura, cuja gama de temperaturas varia entre 0°C e 130°C. Este material permite uma elevada transparência (superior à do polietileno) e um excelente brilho. A sua resistência mecânica é variável, sendo o filme não orientado frágil a temperaturas baixas (Fernando, 2006).

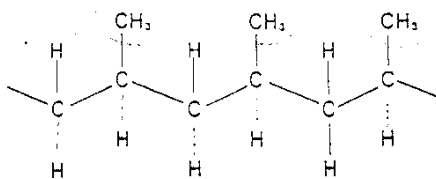


Figura 2.10: Estrutura química do polipropileno.

As principais vantagens das caixas plásticas são a possibilidade de reutilização, a diversidade de tamanhos e formatos, a facilidade de limpeza, a elevada resistência mecânica e à humidade. A principal desvantagem apontada para as caixas de utilização corrente é o espaço ocupado em vazio. Para contornar esta questão podem ser utilizadas caixas encastráveis ou colapsáveis. Na figura 2.11 são apresentadas caixas empilháveis e encastráveis em arcos, de fabrico português. Os arcos podem ser colocados em duas posições distintas para permitir o encaixe dos contentores, uns dentro dos outros ou para permitir o empilhamento, assegurando uma altura para o conteúdo (Poças e Oliveira, 2001).



Figura 2.11: Caixas plásticas empilháveis e encastráveis. (Poças e Oliveira, 2001)

A figura 2.12 mostra uma caixa reutilizável, colapsável e com patilha para permitir o empilhamento sem danificar o produto. Esta caixa tem, adicionalmente, a característica de ser fabricada em material plástico que inclui um aditivo que lhe confere propriedades antibacterianas – o Microban® (Poças e Oliveira, 2001).



Figura 2.12: Caixa plástica com aditivo Microban®. (Poças e Oliveira, 2001)

As embalagens de poli(tereftalato de etileno) (PET) com tampa e fundo formadas por plástico têm vindo a ganhar popularidade porque são versáteis, permitem uma boa protecção do produto e a sua apresentação é visualmente atractiva, como se pode observar na figura 2.13. São habitualmente utilizadas como unidades de venda. Actualmente, existem numerosos produtores, sobretudo produtores frutícolas, que optaram por este tipo de embalagem. Alguns desses produtores acreditam que ao associarem os seus produtos a este tipo de embalagem, que este é identificado pelo consumidor como sendo um produto de elevada qualidade. Este tipo de embalagem permite ainda justificar um valor superior agregado ao produto, uma vez que diminui as perdas por produto deteriorado. É de ter em conta também, que estas embalagens já foram testadas e aprovadas nos mercados mais exigentes da Europa. Para produtos de elevado valor comercial, tais como frutas pequenas, bagas e cogumelos, que podem deteriorar-se facilmente se comprimidos, esta é talvez a melhor opção de embalagem. ^[3]



Figura 2.13: Caixa plástica de PET com tampa.

O PET (figura 2.14) constitui uma média barreira à humidade e a gases, mas uma barreira excelente à gordura. Quanto às suas propriedades térmicas, não solda e a sua gama de temperaturas varia entre -40°C e 220°C. Tem uma excelente resistência à tracção e boa resistência ao impacto/perfuração, além disso tem uma excelente transparência (Fernando, 2006).

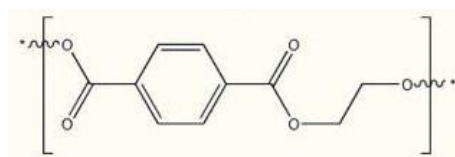


Figura 2.14: Estrutura química do poli(tereftalato de etileno).

2.2 Higiene das Embalagens de Hortofrutícolas

No regulamento (CE) nº 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Outubro de 2004, relativo aos materiais e objectos destinados a entrar em contacto com

os alimentos e que revoga as Directivas 80/590/CEE e 89/109/CEE, é apresentada a definição de materiais usados para fins alimentares, a seguir transcrita:

“Está subjacente ao presente regulamento o princípio segundo o qual qualquer material ou objecto destinado a entrar em contacto directo ou indirecto com os alimentos deve ser suficientemente inerte para excluir a transferência de substâncias para os alimentos em quantidades susceptíveis de representar um risco para a saúde humana ou de provocar uma alteração inaceitável na composição dos alimentos ou uma deterioração das suas propriedades organolépticas.”

No regulamento (CE) nº 2023/2006 da Comissão, de 22 de Dezembro de 2006, estão definidas as regras em matéria de boas práticas de fabrico dos grupos de materiais e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos.

No entanto, estes regulamentos, visam sobretudo o controlo dos perigos químicos que podem estar associados aos materiais e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos.

Em relação ao controlo dos perigos microbiológicos que podem associados a estes materiais, o regulamento 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo à higiene dos géneros alimentícios, refere as seguintes disposições aplicáveis ao acondicionamento e embalagem dos géneros alimentícios:

- os materiais de acondicionamento e embalagem não devem constituir fonte de contaminação;
- todo o material de acondicionamento deve ser armazenado por forma a não ficar exposto a risco de contaminação;
- as operações de acondicionamento e embalagem devem ser executadas de forma a evitar a contaminação dos produtos. Sempre que necessário, como nomeadamente no caso dos recipientes serem caixas metálicas ou frascos de vidro, a sua integridade e limpeza têm de ser verificadas antes do enchimento;
- os materiais de acondicionamento e embalagem reutilizados para os géneros alimentícios devem ser fáceis de limpar e, sempre que necessário, fáceis de desinfectar.

As embalagens contendo produtos hortofrutícolas até chegarem ao consumidor passam pelas seguintes fases, considerando a sua cadeia mais longa e complexa, como no caso de trocas intercontinentais:



Figura 2.15: Representação esquemática de uma cadeia de abastecimento genérica de produtos hortofrutícolas exportados. (Almeida, 2005)

Havendo a reutilização das caixas de madeira e de plástico, é necessário acrescentar a estas fases ainda o armazenamento das embalagens entre utilizações e a sua higienização, bem como outros ciclos idênticos ao que consta na figura 2.15. Daí a importância de todo o cuidado a ter com as embalagens em todas as suas fases, pois a contaminação pode advir não só da própria embalagem, como também do alimento que transporta, do seu local de armazenamento e ainda da manipulação da embalagem durante o transporte, o armazenamento e a comercialização.

A inocuidade dos alimentos consiste na ausência de contaminantes, toxinas e qualquer outra substância que possa converter o alimento em algo nocivo, ou seja, com consequências indesejáveis agudas ou crónicas sobre o organismo. Os perigos que podem surgir quer pelo armazenamento, quer pelo transporte e manuseamento das embalagens, e que se pretendem evitar, são as contaminações biológicas, químicas e físicas, representadas na figura 2.16.



Figura 2.16: Perigos biológicos, como bactérias, insectos, roedores (a) ou fungos (c), físicos, como vidros, lixo, poeiras (b) e químicos, como resíduos de fertilizantes e pesticidas (d).

As diferentes fases de operação às quais está sujeito o produto hortofrutícola, permitem múltiplas ocasiões de contaminação, para além da que ocorre naturalmente no campo, própria do tipo de alimento. Os perigos físicos que podem ser encontrados nos produtos hortofrutícolas e nas embalagens que os acondicionam são, normalmente, os mesmos que aparecem nas indústrias alimentares em geral.

Quadro 2.1: Exemplos de perigos físicos em alimentos.

Material	Danos potenciais	Fontes
Vidro	Cortes, sangramento, podendo requerer cirurgia para encontrar ou retirar a partícula	Garrafas, frascos, lâmpadas, utensílios, janelas, etc.
Madeira	Cortes, infecções, sufocamento, podendo requerer cirurgia para retirar a partícula	Paletes, caixas, materiais de construção, áreas adjacentes
Pedras	Sufocamento; dentes partidos	Chão, áreas adjacentes, materiais de construção
Metal	Cortes, infecções, podendo requerer cirurgia para retirar a partícula	Máquinas, tubagens, utensílios, fios, empregados
Osso	Sufocamento	Processamento impróprio
Plástico	Sufocamento, cortes, infecções, podendo requerer cirurgia para retirar a partícula	Embalagens, utensílios, paletes
Objectos pessoais diversos	Sufocamento, cortes, dentes partidos, podendo requerer cirurgia para retirar a partícula	Empregados

Fonte: ASQ HACCP Handbook, 2002

Geralmente, os perigos físicos que podem surgir associados aos produtos hortofrutícolas e às embalagens que os acondicionam são resultantes de más práticas de higiene e de fabrico (agrícolas), contaminações e máquinas e equipamentos de baixa qualidade e sem manutenção adequada. Os produtos hortofrutícolas também podem ser contaminados devido à utilização de materiais de embalagem impróprios. Os perigos mais comuns que podem surgir são: folhas, ramos, torrões de terra, calhaus, pequenos animais e outros materiais que podem ser colhidos pelas máquinas, juntamente com os frutos e hortícolas; materiais aderentes ao fruto e hortícolas: terra, insectos e seus ovos, larvas, etc; partículas de metal, provenientes de equipamentos; partículas de vidro, provenientes de lâmpadas, janelas e outras fontes; objectos pessoais e outros perigos introduzidos pelos empregados: anéis, relógios, brincos, fragmentos de unha, pêlo e cabelo, entre outros. Os consumidores rejeitam fortemente a presença de insectos, roedores, vidros, pregos, etc. Contudo, visto serem bastante visíveis, são fáceis de detectar e eliminar.

Os contaminantes químicos em frutas e hortaliças frescas podem existir de forma natural ou podem ser adicionados durante a produção agrícola, a manipulação pós-colheita ou as operações de outras unidades (FAO, 1998). Os perigos químicos mais frequentemente associados aos produtos hortofrutícolas são resíduos de pesticidas e fertilizantes, empregues no cultivo destes produtos, e metais pesados (chumbo, estanho, mercúrio, cádmio, entre outros), que podem estar presentes no solo de cultivo, na água e nas embalagens. Em termos do acondicionamento e embalagem dos produtos hortofrutícolas, há ainda a considerar os perigos químicos associados aos produtos de limpeza e desinfecção das embalagens e das estruturas associadas ao transporte, armazenamento e comercialização. Efectivamente, a não eliminação destes produtos nos processos de higienização, pode originar a contaminação química dos alimentos, a qual poderá ser tóxica por ingestão. A presença de substâncias químicas nocivas em elevados níveis tem sido associada a respostas tóxicas agudas e a enfermidades crónicas (FAO, 1998).

Os dados recolhidos e compilados pelo Programa de Avaliação e Controlo da Contaminação da OMS/WHO indicam que, em muitos países, os níveis de contaminação química tendem a decair. Esta tendência deve-se, em parte, às maiores restrições no uso de produtos químicos tóxicos e pesticidas que persistem no ambiente e a um melhor controlo da contaminação do ambiente (FDA, 1998).

Os microrganismos transmitidos pelos alimentos, como as bactérias, as leveduras, os fungos, os vírus e os parasitas, são frequentemente conhecidos como perigos biológicos (FAO, 1998; FDA, 2001). Alguns fungos são capazes de produzir toxinas e também se incluem neste grupo de perigos. Os microrganismos encontram nos diversos alimentos, as substâncias nutritivas e as condições ambientais necessárias para crescerem e se multiplicarem.

Alguns dos microrganismos são, contudo, benéficos para o ser humano, encontrando-se mesmo envolvidos na produção de alimentos fermentados como o pão, o queijo, o vinho e a cerveja. Algumas propriedades de determinados microrganismos podem ainda ser utilizadas pela indústria (não só a alimentar) na elaboração de outro tipo de produtos, como por exemplo na produção de antibióticos. O homem pode ainda beneficiar de outras funções dos microrganismos como a degradação da matéria orgânica e o enriquecimento do solo (Frazier e Westhoff, 1991).

No entanto, alguns microrganismos podem provocar doenças, devido à sua transmissão pela ingestão de alimentos contaminados. Os microrganismos capazes de originar situações de doença podem estar presentes nos alimentos crus. Em determinadas ocasiões, fazem mesmo parte da microflora da fruta ou da hortalça como contaminantes fortuitos provenientes do solo, pó ou ambiente circundante. Noutros casos são introduzidos nos alimentos através de práticas de manipulação e produção incorrectas, como o uso de água de rega contaminada, rega com águas residuais, fertilização com lamas de estações de tratamento de águas residuais e/ou estrumes ou ausência de práticas de manipulação higiénicas (Frazier e Westhoff, 1991).

No caso das frutas, apesar de possuírem uma elevada actividade de água (factor que propicia o crescimento microbiano), o seu pH baixo implica que as suas contaminações são predominantemente devidas a bolores e leveduras, mas sobretudo pelos primeiros (Adams e Moss, 1997). No entanto, verifica-se que há uma especificidade de determinados microrganismos para determinados frutos. Assim, para os citrinos, verifica-se sobretudo contaminação com *Penicillium italicum* e *P. digitatum*, enquanto o *P. expansum* tem maior especificidade para maçãs (Adams e Moss, 1997). Neste fruto, bem como em peras, também se podem encontrar os ascomicetas *Venturia inaequalis* e *Monilia fructigena* (Adams e Moss, 1997). As hortalças, uma vez que têm valores de pH mais elevados nos seus tecidos, apresentam maior sensibilidade para a invasão bacteriana que as frutas, mas também são sensíveis à contaminação de alguns fungos (Adams e Moss, 1997). Um exemplo é o *Botrytis cinerea*, que para além de aparecer como contaminante de frutos, também pode ser detectado em hortalças (Adams e Moss, 1997). As espécies mais comuns de bactérias encontradas em hortícolas são espécies pectinolíticas dos géneros Gram-negativos *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, bem como *Clostridium* (Adams e Moss, 1997). A contaminação dos frutos e hortícolas, por estes microrganismos pode originar a contaminação das embalagens que os acondicionam e a contaminação de outros produtos acondicionados se as embalagens não forem devidamente higienizadas entre utilizações.

Outras bactérias que aparecem frequentemente nas hortalças são *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Aeromonas hydrophila*, cuja contaminação é devida ao contacto com os ambientes circundantes habituais destas bactérias. Nomeadamente, os seus habitats são o solo, águas residuais

ou de rega, fezes de animais, etc. (Adams e Moss, 1997). As bactérias patogénicas podem, portanto, contaminar facilmente as frutas e hortaliças se estas não forem manipuladas adequadamente antes de consumidas, e também as embalagens que acondicionam estes alimentos. Os microrganismos patogénicos ou os produtos metabólicos por eles produzidos, se forem nocivos, podem ser causadores de doenças como, por exemplo, botulismo, salmonelose, hepatite, tuberculose, etc. (Gilbert, 2000).

As bactérias patogénicas associadas às frutas e hortaliças incluem (FDA, 2001):

- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Escherichia coli* (estirpes patogénicas)
- Espécies de *Campylobacter*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Listeria monocytogenes*
- *Staphylococcus aureus*
- Espécies de *Clostridium*
- *Bacillus cereus*
- Espécies de *Vibrio*

Podem encontrar-se microrganismos patogénicos entre a microflora de frutas e hortaliças, já que é muito fácil que as superfícies externas destes produtos entrem em contacto com o solo, a água, as águas residuais, o ar, as pessoas e os animais (Suslow, 1997). Quando as condições são favoráveis para a reprodução da flora natural, estes patogénicos também se reproduzem (Beuchat, 1998).

Um amplo número de patogénicos bacterianos tem sido implicado em surtos de doença transmitida pelos alimentos associados ao consumo de frutas e hortaliças frescas. Bactérias como o *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* podem encontrar-se no solo e contaminam facilmente os produtos. Outras bactérias como a *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* patogénica e *Campylobacter* residem no tracto intestinal dos animais e/ou humanos. Podem contaminar as frutas e hortaliças através da infiltração de águas residuais nos campos, da rega com água contaminada, da presença de animais no campo ou de uma incorrecta adubação. A contaminação também pode ser devida à manipulação dos produtos durante a colheita e o embalamento ou noutros passos da cadeia de distribuição e comercialização (Beuchat, 1998).

A prevenção da contaminação bacteriana constitui o factor de controlo mais importante para reforçar a segurança do produto. Também é fundamental realizar os passos necessários para garantir que os patogénicos presentes não possam reproduzir-se até ser

atingido um risco elevado. O conhecimento do processo de crescimento da população bacteriana permite descobrir as possibilidades de prevenção e controlo da sua proliferação. A fim de evitar que a população de bactérias alcance níveis que possam supor uma ameaça para a saúde humana, é necessário manter baixos os valores iniciais e assegurar-se que os microrganismos que chegam ao produto não conseguem passar da fase de latência.

A fim de evitar a reprodução dos patogénicos nos produtos, deve controlar-se (FDA, 1998; Bartz, 1999):

- A disponibilidade de nutrientes
- A humidade
- A acidez
- A temperatura
- O oxigénio

Para se poderem reproduzir, as bactérias necessitam dos nutrientes adequados e das condições ambientais apropriadas, como a humidade, o oxigénio e a temperatura (FDA, 1998; Bartz, 1999). Cada tipo de bactéria tem requisitos específicos para conseguir um desenvolvimento óptimo, mas também podem multiplicar-se e provocar doença fora dessas condições óptimas. Por exemplo, para se proliferar mais rapidamente, a *E. coli* requer uma temperatura de 37°C. Contudo, pode multiplicar-se dentro de uma escala de temperatura entre 10 e 46°C (Beuchat, 1998). O *Bacillus cereus* tem uma temperatura óptima de crescimento de 30°C, mas pode proliferar numa escala de temperatura entre 10 e 49°C (Beuchat, 1998).

De forma a garantir a segurança alimentar e de forma a evitar as situações que possam favorecer a contaminação dos materiais, as embalagens de produtos hortofrutícolas devem permanecer longe de qualquer fonte de contaminação. Os materiais de embalagem, como caixas de madeira, cartão, sacos de rede plástica, entre outros, devem conservar-se num lugar designado para este propósito. Esta área deve estar limpa, seca e isenta de resíduos, insectos e animais.^[3]

Durante as operações de embalagem é importante evitar danificar os contentores: as caixas não devem empilhar-se de forma incorrecta, uma vez que este sistema pode danificar as embalagens e pode originar a contaminação dos produtos. Deveriam sempre utilizar-se caixas e sacos novos. No caso de os materiais serem reutilizados, estes deveriam ser convenientemente higienizados e desinfectados, entre utilizações, para evitar a contaminação cruzada. No caso de serem utilizados sacos de plástico, assim como no caso das embalagens que tenham superfícies em contacto com os alimentos, estes devem ser fabricados num material para uso alimentar ou para contacto com alimentos (símbolo na figura 2.17)(Regulamento 1935/2004) para evitar a migração de contaminantes químicos para os produtos frescos.^[3]



Figura 2.17: Símbolo que identifica materiais para contacto com alimentos.



Figura 2.18: Exemplos de mau acondicionamento de embalagens. (Camelo, 2004)

Devem respeitar-se os seguintes requisitos para o armazenamento de frutas e hortaliças frescas (De Roever, 1999):

- Todos os produtos devem armazenar-se num lugar limpo, seguindo um sistema organizado. Os códigos e a rotação de inventários são importantes para minimizar o tempo que o produto permanece armazenado e para facilitar a retirada em caso de problemas a jusante na cadeia alimentar;
- As caixas contendo os produtos devem colocar-se em prateleiras para evitar o contacto directo com o solo;
- Deve haver uma separação mínima entre as prateleiras e a parede de 45 cm. Devem deixar-se 10 cm entre as prateleiras e o solo. Estas separações permitem uma ventilação adequada e facilitam a limpeza e a inspecção para detectar a presença de roedores e insectos;
- Não devem armazenar-se produtos químicos, resíduos, desperdícios ou material oleoso perto dos produtos;
- As áreas ou câmaras de armazenamento de frutas e hortícolas devem ter um controlo preciso e registado da temperatura e humidade para prevenir ou retardar a proliferação microbiana. A temperatura de armazenamento adequada e a humidade relativa variam consideravelmente dependendo do produto e seus requisitos específicos;

- As paredes, solos e tectos devem limpar-se sistemática e periodicamente para evitar a acumulação de sujidade;
- Independentemente da envergadura da operação de produção, as boas práticas de fabrico (BPFs) são essenciais para garantir a consistência na qualidade dos produtos frescos e para prevenir que o ambiente de manipulação se converta numa fonte de contaminação microbiana, física ou química;
- É importante manter todas as áreas de embalagem e armazenamento livres de produtos químicos, lixos, maquinaria, resíduos de colheitas e materiais de desperdícios para não fomentar as pragas e prevenir a contaminação dos produtos hortofrutícolas nas instalações;
- Todo o equipamento utilizado para lavar e classificar os produtos hortofrutícolas frescos deve ser planeado de forma a facilitar a sua limpeza e deve ser mantido adequadamente para prevenir a contaminação;
- Para prevenir a contaminação dos produtos hortofrutícolas, os contentores utilizados para a colheita de frutas e hortaliças, para o seu transporte, embalagem e armazenamento, devem estar limpos e desinfectados e manter-se intactos. Os contentores de plástico devem ser de plástico de grau alimentar;
- Os resíduos e os desperdícios de frutas ou hortaliças podem ser uma fonte de contaminação biológica. Os resíduos e materiais residuais devem armazenar-se em lugares especiais, em contentores que devem permanecer fechados, e devem ser recolhidos diariamente. O lugar de recolha tem de estar construído para uma fácil limpeza, devendo estar localizado de forma a que o vento não leve os odores até às instalações de produção e embalagem ou à zona circundante;
- A limpeza, desinfectação e o controlo de temperatura nas câmaras de armazenamento são factores cruciais para minimizar a contaminação, reduzir as pragas e manter a segurança e qualidade dos produtos. Deve existir um programa de limpeza e desinfectação estabelecido para todas as áreas de armazenamento dos produtos hortofrutícolas;
- Os produtos não devem ser transportados em contentores que tenham sido utilizados para transportar pescado, carne crua, ovos e outros produtos que são importantes fontes de patogénicos transmitidos pelos alimentos, a menos que os ditos contentores tenham sido adequadamente limpos e desinfectados. As unidades refrigeradas devem manter as temperaturas adequadas para a segurança e qualidade dos produtos hortofrutícolas.

É necessário um cuidado extra no armazenamento das caixas contendo os produtos hortofrutícolas, para que não haja um aumento da contaminação que possa advir dos próprios produtos pelo armazenamento e manuseamento das embalagens que os contêm. Para tal, é necessário que o armazenamento seja num local fechado apropriado, em que não esteja sujeito a qualquer tipo de contaminação e que possua condições que não favoreçam o seu desenvolvimento (tendo em conta os seguintes factores: condições

aeróbias, ou por vezes anaeróbias, nutrientes, humidade, temperatura e pH) (Camelo, 2004; Beyer e Guðbjörnsdóttir, 2002)

Desde que as frutas e as hortaliças saem do campo até chegarem à mesa, têm lugar diversas actividades, nas quais se incluem as relacionadas com a produção e operações pós-colheita (embalamento, transporte e armazenamento). A aplicação de programas como o emprego de Boas Práticas Agrícolas (BPA's) e Boas Práticas de Fabrico (BPF's) constituem passos importantes para reduzir os possíveis riscos associados aos produtos agrícolas, ao longo das cadeias de produção e de distribuição (Stiller-Cepeda, 2002).

Para a embalagem de produtos hortofrutícolas, devem ser usadas caixas novas ou limpas (Camelo, 2004). No caso das embalagens reutilizadas, acresce o problema de contaminação cruzada se a higienização não for a adequada ou insuficiente ou pior ainda se for inexistente. Por isso, estas embalagens reutilizadas devem ser limpas e desinfectadas correctamente antes de serem usadas novamente (Camelo, 2004).

3. Materiais, Métodos e Ensaio

Como referido, o presente trabalho pretende contribuir para o estudo da utilização das embalagens de madeira *versus* embalagens de plástico, sob o ponto de vista do factor higiene.

Para avaliar, do ponto de vista do factor higiene, as embalagens de madeira e as embalagens de plástico programaram-se três ensaios. No primeiro ensaio, tentou-se estudar e comparar a contaminação microbiana verificada em embalagens de madeira e de plástico. Neste caso, caracterizaram-se em termos de contaminação microbiana as embalagens, de madeira e de plástico, utilizadas no transporte e comercialização de produtos hortofrutícolas. As amostras foram recolhidas no MARL (Mercado Abastecedor da Região de Lisboa), local onde estes dois tipos de embalagens são comumente utilizados. No segundo ensaio, foi estudada a evolução da flora microbiana existente em embalagens novas, quer de madeira, quer de plástico, ao longo do tempo, sob diferentes condições de temperatura e humidade. No terceiro ensaio, pretendeu-se estudar a evolução da sobrevivência de bolores e leveduras e de *Bacillus cereus* (organismos habitualmente detectados em produtos hortofrutícolas) em embalagens de madeira e de plástico, em diferentes condições de humidade e temperatura.

3.1. Ensaio 1

As caixas de madeira têm sido tradicionalmente utilizadas no acondicionamento de produtos hortofrutícolas. No entanto, estas caixas têm vindo a ser substituídas por caixas de plástico, por se considerar que estas últimas são mais higiénicas e mais fáceis de lavar e desinfetar. Como tal, as caixas de madeira utilizadas no acondicionamento e transporte de produtos hortofrutícolas foram testadas e comparadas com caixas de plástico, utilizadas com o mesmo fim, em termos da sua contaminação microbiana. Neste ensaio, foram efectuadas quatro amostragens no MARL, local escolhido por apresentar um elevado número de trocas comerciais e também de variedade de produtos e materiais de embalagem. Estas amostragens foram realizadas nos dias 7 de Dezembro de 2007, 23 de Janeiro de 2008, 13 de Maio de 2008 e 16 de Julho de 2008.

Em cada amostragem, foram recolhidas igual número de amostras em embalagens de madeira e de plástico, contendo produtos hortofrutícolas, perfazendo um total, nas quatro amostragens, de trinta e duas amostras. Tentou-se, para o mesmo tipo de produto (por exemplo, laranjas) recolher amostras em caixas de madeira e de plástico, para efeitos de comparação. As caixas a partir das quais foram recolhidas as amostras apresentavam três dimensões diferentes: 60 x 40 x 20 cm³; 50 x 30 x 15 cm³; 50 x 30 x 20 cm³.

3.1.1. Métodos

A recolha das amostras para a análise microbiológica foi efectuada de acordo com a NP 1828, utilizando-se para tal aparelhos e utensílios de material inerte, limpo e esterilizado. As colheitas foram efectuadas com os indispensáveis cuidados de assepsia e de modo a que representem devidamente as características microbiológicas das superfícies das caixas de hortofrutícolas a analisar.

Para controlar a higiene das embalagens utilizadas no transporte de produtos hortofrutícolas quantificou-se a flora microbiana existente na sua superfície. As amostras foram colhidas pela técnica da zaragatoa de acordo com o procedimento descrito na Decisão Europeia 2001/471/CE. De acordo com este procedimento, as zaragatoas de algodão, esterilizadas, foram humedecidas antes da recolha das amostras em caldo Triptona-sal (0,1% Triptona (Becton, Dickinson and Company) + 0,85% NaCl). A área de amostragem para o esfregaço abrangeu pelo menos 100 cm² por local de amostragem. A zaragatoa foi humedecida durante pelo menos cinco segundos no solvente e esfregada primeiro verticalmente, depois horizontalmente e por fim na diagonal durante não menos de 20 segundos por uma parte representativa da superfície da embalagem (figura 3.1). Após a utilização da zaragatoa húmida, repetiu-se o processo de amostragem com uma zaragatoa seca. Ambas as zaragatoas foram recolhidas para um frasco contendo 50 ml de Triptona-sal.



Figura 3.1: Colheita de amostras no MARL, no dia 23/01/2008, em embalagens de madeira contendo alfaces e pêras.

A conservação e transporte das amostras foram efectuados de acordo com a NP 1828, ou seja, a temperatura entre 0 e 4°C, tendo sido examinadas num espaço de tempo inferior a 24 horas.

A preparação das amostras foi efectuada de acordo com a NP 1829, tendo-se utilizado aparelhos e utensílios de material inerte, limpo e esterilizado. De acordo com a NP 1829, a preparação das amostras foi efectuada de modo a conduzir a uma perfeita uniformidade da distribuição dos microrganismos e com os indispensáveis cuidados de assepsia de modo a evitar qualquer contaminação.

Na aplicação das metodologias a seguir descritas e na quantificação microbiana utilizaram-se as seguintes referências normativas:

NP 2079, a qual descreve as regras gerais para análise microbiológica, a EN ISO 6887-1, a qual descreve as regras gerais para a preparação da suspensão inicial e das diluições decimais, a ISO 8199, a qual descreve as regras gerais para a contagem de microrganismos e a ISO/TS 11133-1 e ISO/TS 11133-2, as quais descrevem as regras gerais na preparação e produção de meios de cultura.

Para determinar a contaminação das embalagens, ao nível microbiológico, escolheram-se os microrganismos que são habitualmente identificados com mais frequência em produtos hortofrutícolas bem como os que podem resultar do manuseamento das embalagens pelos operadores e pelas suas condições de utilização, de acordo com Adams e Moss (1997). Assim, efectuaram-se as seguintes determinações nas amostras: contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C, contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C, contagem de bactérias coliformes, contagem de enterococos, contagem de *Escherichia coli*, contagem de *Clostridium perfringens*, contagem de *Pseudomonas* e contagem de *Bacillus cereus*.

3.1.1.1 Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C (ISO 6222:1999)

Sementeira por incorporação de uma quantidade determinada da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais, em meio de cultura apropriado (meio Plate Count Agar, Becton, Dickinson and Company). Incubação das placas semeadas, durante 44 ± 4 h à temperatura de 36 ± 2 °C e durante 68 ± 4 h à temperatura de 22 ± 2 °C, em aerobiose. Cálculo do número de microrganismos por cm², a partir do número de colónias desenvolvidas nas placas seleccionadas.

3.1.1.2 Contagem de bolores e leveduras a 25°C (NP 3277-1:1987)

Sementeira em superfície de uma quantidade determinada da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais, em meio de cultura apropriado (meio Cooke Rose Bengal, Himedia, contendo clorotetraciclina). Incubação das placas semeadas, durante 120 ± 2 h à temperatura de 25 ± 1 °C, em aerobiose. Cálculo do número de microrganismos por cm², a partir do número de colónias desenvolvidas nas placas seleccionadas.

3.1.1.3 Contagem de bolores e leveduras a 37°C (NP 3277-2:1987)

Sementeira em superfície de uma quantidade determinada da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais, em meio de cultura apropriado (meio Cooke Rose

Bengal, Himedia, contendo clorotetraciclina). Incubação das placas semeadas, durante 72 ± 2 h à temperatura de 37 ± 1 °C, em aerobiose. Cálculo do número de microrganismos por cm^2 , a partir do número de colónias desenvolvidas nas placas seleccionadas.

3.1.1.4 Contagem de bactérias coliformes (ISO 4831:2006)

Uma série de tubos contendo caldo verde brilhante (Himedia), meio selectivo confirmativo da presença de bactérias coliformes, foram inoculados com quantidades apropriadas da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais. Os tubos de fermentação inoculados foram incubados a 30 ± 1 °C. Após 24 ± 2 h e 48 ± 4 h de incubação consideram-se positivos os tubos em que se nota turvação e formação de gás no tubo de Durham, devendo o gás atingir pelo menos 1/10 da altura do tubo. O cálculo do número mais provável (NMP) de organismos por cm^2 é estimado a partir do número e da distribuição de tubos que apresentam reacção positiva.

3.1.1.5 Contagem de *Escherichia coli*

Seguindo a metodologia indicada na NP 2308 (1986), repicagem, a partir de cada um dos tubos de verde brilhante que deram resultado positivo na pesquisa e contagem de bactérias coliformes de uma ansa com cultura para caldo verde brilhante e outra para água peptonada (1% Peptona (Becton, Dickinson and Company) + 0,5% NaCl). Incubação em banho de água a $44,5 \pm 0,5$ °C durante 48 ± 2 h. Verificação de produção de gás no meio de cultura de verde brilhante e de produção de indol na água peptonada (formação de um anel sobrenadante vermelho, após adição de cerca de 1 ml de reagente de Kovacs, seguido de agitação e repouso). Consideram-se positivos os tubos que apresentam resultados positivos simultaneamente nos dois testes atrás indicados.

O cálculo do número mais provável (NMP) de organismos por cm^2 de amostra é estimado a partir do número e da distribuição de tubos que apresentam reacção positiva, tal como descrito na ISO 8199 (2005).

Em relação à contagem de *E. coli*, não foi utilizada a metodologia indicada no Regulamento (CE) nº 1441/2007 da Comissão e indicada na norma ISO 16649-2 (2001). Foi utilizado o método descrito o qual tem vindo correntemente a ser utilizado no Laboratório de Microbiologia do Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera. No entanto, este método apresenta resultados comparáveis aos resultados obtidos pela metodologia indicada pelo Regulamento nº 1441/2007 (Abrantes, 2007).

3.1.1.6 Contagem de Enterococos (ISO 7899-1: 1998)

Uma série de tubos contendo caldo de dextrose de azida (Becton, Dickinson and Company), presumptivo da presença de Enterococos, foram inoculados com

quantidades apropriadas da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais. Os tubos de fermentação inoculados foram incubados a 37 ± 1 °C. Após 48 ± 3 h de incubação consideram-se positivos os tubos que apresentam turvação.

Repicagem, a partir de cada um dos tubos contendo dextrose de azida que deram resultado positivo presumptivo, de uma ansa com cultura para caldo EVA (Azida de Violeta de Etilo, Biokar Diagnostics) confirmativo da presença de Enterococos. Incubação a 37 ± 1 °C durante 48 ± 3 h. A turvação do meio e/ou a formação de um depósito de cor azul-arroxeadada no fundo do tubo, indicam uma reacção positiva, confirmando a presença de Enterococos. O cálculo do número mais provável (NMP) de organismos por cm^2 de amostra é estimado a partir do número e da distribuição de tubos que apresentam reacção positiva.

3.1.1.7 Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* (Dutka, 1978)

Uma série de tubos contendo meio de asparagina modificado, presumptivo da presença de *Pseudomonas aeruginosa*, foram inoculados com quantidades apropriadas da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais. Este meio de cultura não está disponível na forma desidratada tendo sido necessária a sua preparação. O meio de asparagina modificado tem a seguinte composição:

Asparagina, L (-)	2,0 g
Prolina, L (-)	1,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄	0,5 g
K ₂ SO ₄	10,0 g
Etanol	26 ml
Água Destilada	1000 ml
pH = $7.0 \pm 0,2$	

Depois de preparado, o meio foi distribuído em tubos e esterilizado em autoclave durante 15 minutos.

Os tubos inoculados foram incubados a $44,5 \pm 0,5$ °C, durante 8 – 10 dias. A turvação do meio e/ou a formação de uma fina película superficial, constituem uma reacção positiva, presumptiva de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.1.1.8 Contagem de *Clostridium perfringens* (Fernando, 1996)

Uma série de tubos contendo “Litmus Milk” (Becton, Dickinson and Company), presumptivo da presença de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras - *Clostridia*, foram inoculados com quantidades apropriadas da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais. A cada tubo foi ainda adicionada parafina líquida, de modo a garantir condições de anaerobiose na cultura. Os tubos inoculados foram incubados a 37 ± 1 °C. Após 48 ± 3 h de incubação consideram-se positivos os tubos que apresentam o meio hidrolisado (com aspecto “talhado”) e com alteração da cor de lilás para rosa e creme.

3.1.1.9 Contagem de *Bacillus cereus* (National Standard Method F15i1.4, 2005)

Sementeira em superfície de 0,1 ml da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais, em meio de cultura apropriado (*Bacillus cereus* Agar, de acordo com Mossel, Biokar Diagnostics, contendo gema de ovo e polimixina B). Incubação das placas semeadas, entre 24 e 48 h à temperatura de 30 ± 1 °C, em aerobiose. A partir de cada placa foram seleccionadas as colónias características (colónias de cor rosa, rodeadas por um precipitado) para confirmação. Cada colónia seleccionada foi inoculada em meio de nitratos (0,5% de peptona (Becton, Dickinson and Company) + 0,3% extracto de carne (Becton, Dickinson and Company) + 0,1% KNO₃). Os tubos foram incubados a 30 ± 1 °C, durante 22 ± 2 h. Consideram-se como positivos os tubo que apresentam a cor vermelha após adição de 0,2 ml da seguinte mistura: reagente A:Reagente B, 1:1. Reagente A, ácido 5-amino-2-naftaleno-sulfónico 0,1% em ácido acético 15% (v/v). Reagente B, ácido sulfanílico, 0,4% em ácido acético 15% (v/v). O cálculo do número de microrganismos por cm², foi efectuado a partir do número de colónias características confirmadas desenvolvidas nas placas seleccionadas.

Em todas as metodologias, os reagentes químicos usados tinham grau de pureza analítico.

3.1.2. Análise estatística

A interpretação estatística dos resultados, foi efectuada, de modo a verificar o nível de significância das variações obtidas (Análise de variância - ANOVA), para cada um dos parâmetros analisados, entre o tipo de embalagem (madeira e plástico), entre o tipo de alimento acondicionado (frutos ou hortícolas), bem como entre diferentes épocas do ano. Recorreu-se para tal ao programa Microsoft® Excel 2007.

3.2. Ensaio 2

No segundo ensaio, pretendeu-se avaliar a susceptibilidade de cada um dos materiais (madeira e plástico) à contaminação circundante a que estão sujeitas as caixas durante o transporte, o armazenamento e a comercialização de produtos hortofrutícolas. Para esse efeito, foi estudada a evolução da contaminação microbiana dos materiais em estudo, madeira e plástico, em diferentes condições ambientais, durante um período de três meses, de embalagens de hortofrutícolas.

Neste ensaio foi utilizada madeira de pinho de diferentes proveniências: Alto Minho, Castelo de Paiva e Mealhada. Foram também utilizados diferentes plásticos: PP e PEAD. As amostras utilizadas neste ensaio apresentavam uma área de cerca de 100 cm². Estes materiais foram incubados em diferentes condições ambientais: C1: 4-7°C, 80-82%H, que simulam o ambiente em refrigeração; C2: 20°C, 55-60%H, que simulam o ambiente em espaços de armazenamento fechado e com temperatura controlada; C3: 15-30°C, 50-80%H, que simulam o ambiente em diversas situações de armazenamento e transporte, quer interior, quer exterior, assim como o efeito da oscilação dos vários factores ambientais. Nas condições de C1, como as placas foram colocadas numa arca frigorífica, utilizada no acondicionamento de produtos alimentares, nas instalações do Edifício Departamental, da FCT/UNL, estas ficaram sujeitas à contaminação habitual que ocorre neste tipo de espaço de armazenamento e transporte. Nas condições de C2, como as placas foram colocadas num espaço com temperatura controlada, utilizado no acondicionamento de produtos alimentares, nas instalações do Edifício Departamental, da FCT/UNL, estas ficaram sujeitas à contaminação habitual que ocorre neste tipo de espaço de armazenamento e transporte. Nas condições de C3, como as placas foram colocadas no exterior do Edifício Departamental, da FCT/UNL, tendo ficado expostas ao ambiente circundante, estas ficaram sujeitas à contaminação habitual que ocorre neste tipo de condições. O ensaio foi realizado em triplicado. Efectuaram-se as seguintes determinações nas amostras: contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C, contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C, contagem de bactérias coliformes, contagem de enterococos, contagem de *Escherichia coli*, contagem de *Clostridium perfringens*, contagem de *Pseudomonas* e contagem de *Bacillus cereus*. Escolheram-se estes microrganismos pelas mesmas razões já apresentadas no Ensaio 1.

Os métodos utilizados na recolha, conservação, transporte e preparação das amostras são os que já foram indicados no ponto 3.1.1. As metodologias utilizadas na quantificação microbiana foram também já referidas no ponto 3.1.1.

A interpretação estatística dos resultados, foi efectuada, de modo a verificar o nível de significância das variações obtidas (Análise de variância - ANOVA) entre o tipo de embalagem (madeira e plástico) e entre as condições experimentais estudadas, para cada microrganismo pesquisado. Recorreu-se para tal ao programa Microsoft® Excel 2007.

3.3. Ensaio 3

No terceiro ensaio, as madeiras e os plásticos, previamente esterilizados, foram contaminados com uma cultura contendo bolores e leveduras. Foi estudada a evolução desta contaminação sob diferentes condições de temperatura e humidade ao longo de cerca de 20 dias. Em paralelo, foi realizado um ensaio no qual os materiais foram contaminados com uma cultura pura de *Bacillus cereus*. Os materiais utilizados neste Ensaio foram colocados em caixas de Petri, com diâmetro de cerca de 15 cm. Como estas caixas ficaram fechadas, os materiais contaminados não ficaram sujeitos à contaminação circundante. Pretendeu-se com estes ensaios comparar, ao longo do tempo, a evolução da contaminação microbiana quantificada nos dois tipos de materiais estudados (madeira e plástico). A análise dos resultados permitirá verificar se existem diferenças entre os materiais (madeira e plástico) em termos das condições que possam favorecer a manutenção e o crescimento da contaminação. Escolheram-se estes microrganismos (bolores e leveduras e *B. cereus*), por serem os que mais usualmente contaminam este tipo de materiais, utilizados no acondicionamento e transporte de produtos hortofrutícolas.

Neste ensaio foi utilizada madeira de pinho de diferentes proveniências: Alto Minho, Castelo de Paiva e Mealhada. Foram também utilizados diferentes plásticos: PP e PEAD. As amostras utilizadas neste ensaio apresentavam uma área de cerca de 100 cm². Estes materiais foram inoculados com 10 ml de uma cultura de bolores e leveduras ($2,8 \times 10^4$ ufc/ml) e ao longo de cerca de 20 dias determinou-se a evolução da contaminação, em diferentes condições ambientais (7°C e 20°C). Em relação às madeiras, estudou-se também o efeito da percentagem de humidade existente na madeira (7-10%H e 20-25%H). Nesta situação, adicionámos água destilada às madeiras até elas apresentarem a humidade pretendida. O ensaio foi realizado em triplicado.

Neste ensaio foi também avaliada a contaminação das madeiras e dos plásticos, com *Bacillus cereus*. Estes materiais foram inoculados com 10 ml de uma cultura pura deste microrganismo ($6,3 \times 10^7$ ufc/ml) tendo sido determinada a evolução desta contaminação ao longo de cerca de 20 dias. Neste ensaio também se estudaram diferentes condições de temperatura para ambos os materiais (7°C e 20°C) e de humidade para a madeira (7-10%H e 20-25%H). O ensaio foi realizado em triplicado.

Na escolha das condições de temperatura, pretendeu-se simular o ambiente em refrigeração (7°C) e o ambiente em espaços de armazenamento fechado e com temperatura controlada (20°C). Nas condições de refrigeração, as placas foram colocadas numa arca frigorífica, nas instalações do Edifício Departamental, da FCT/UNL. Nas condições de temperatura a 20°C, as placas foram colocadas num espaço com temperatura controlada, nas instalações do Edifício Departamental, da FCT/UNL. Pretendeu-se estudar o efeito da percentagem de humidade na madeira para

tentar perceber se as madeiras mais húmidas, podem ou não favorecer o desenvolvimento dos microrganismos utilizados na contaminação das placas. As madeiras contendo 7-10% de H, representam uma madeira que se considera seca. As madeiras contendo 20-25% de H, representam uma madeira encharcada.

Os métodos utilizados na recolha, conservação, transporte e preparação das amostras são os que já foram indicados no ponto 3.1.1. As metodologias utilizadas na quantificação microbiana foram também já referidas no ponto 3.1.1. (3.1.1.2 e 3.1.1.9).

A interpretação estatística dos resultados foi efectuada, de modo a verificar o nível de significância das variações obtidas (Análise de variância - ANOVA), para cada uma das contaminações experimentadas (bolores e leveduras e *B. cereus*), entre o tipo de embalagem (madeira e plástico) e entre as condições experimentais estudadas. Recorreu-se para tal ao programa Microsoft® Excel 2007.

4. Apresentação e Discussão de Resultados

4.1 Ensaio 1

O quadro 4.1 e a figura 4.1 apresentam os resultados obtidos referentes à contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C, nas amostras recolhidas no MARL, nas diversas colheitas efectuadas e tendo em conta o produto hortofrutícola acondicionado e o tipo de material da embalagem.

Quadro 4.1: Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.

Data de Colheita	Alimento	Material	Germes a 22°C	Germes a 36°C
07-12-07	Maçã	Madeira	4,21	0,85
	Uva	PEAD	5,63	3,31
	Tomate	Madeira	5,16	2,05
	Laranja	PEAD	6,06	2,91
	Couve Coração	Madeira	9,33	4,79
	Couve Coração	PEAD	11,7	2,92
23-01-08	Pêra	Madeira	1,93	0,98
	Pêra	Plástico	4,14	3,87
	Maçã	Madeira	3,33	2,82
	Maçã	PEAD	1,86	2,95
	Alface	Madeira	2,69	3,28
	Alface	PP	3,31	1,40
	Nabiças	Madeira	3,05	4,30
	Nabiças	Plástico	3,20	3,29
13-05-08	Nectarina	Plástico	2,95	2,41
	Ameixa	Madeira	1,72	1,98
	Damasco	Madeira	5,69	4,80
	Ameixa	Plástico	3,51	3,26
	Tomate	Madeira	3,88	3,67
	Tomate	PEAD	2,51	2,42
	Courgette	Madeira	3,23	3,21
	Courgette	Plástico	5,45	5,56
16-07-08	Maçã Reineta	PEAD	3,17	2,27
	Maçã Reineta	Madeira	<0,65	1,45
	Limão	Madeira	1,52	<0,65
	Pêra	PEAD	3,17	1,94
	Alperce	PEAD	3,50	<0,65
	Alperce	Madeira	2,94	<0,51
	Couve	Madeira	3,22	2,67
	Couve	Plástico	3,29	2,84
	Couve	Madeira	4,25	3,03
	Couve	Plástico	3,00	2,11

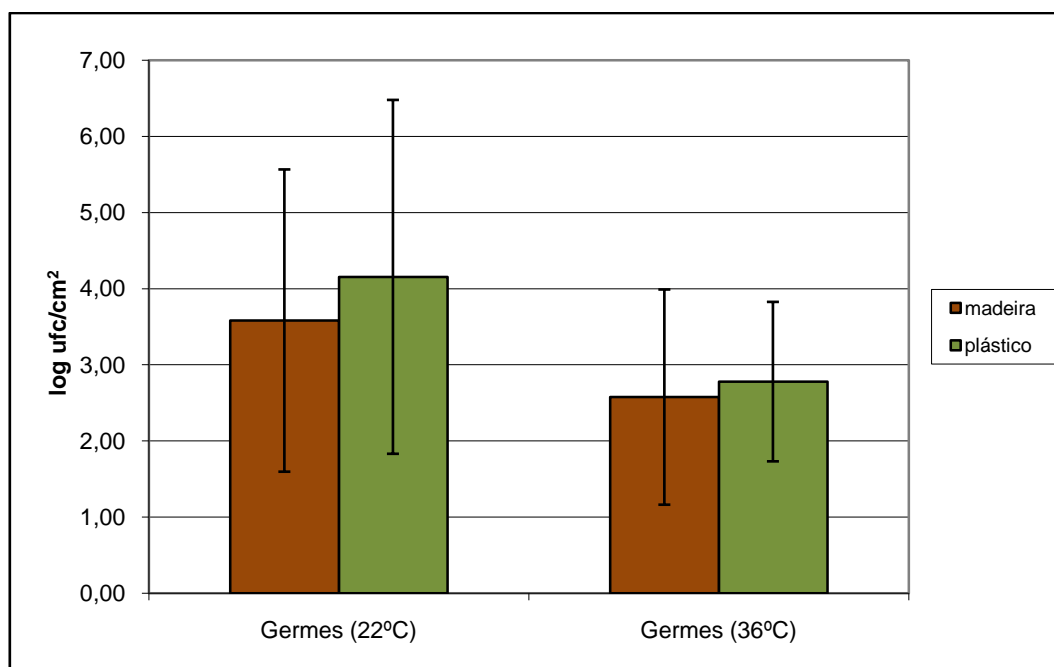


Figura 4.1: Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.

Como se pode observar na figura 4.1, verificou-se uma maior contaminação, em termos de microrganismos totais viáveis, em ambas as temperaturas de incubação (22°C e 36°C), no plástico do que na madeira. No entanto, esta diferença não tem significado estatístico ($P = 0,46$). Pode-se ainda observar que a contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C apresentou valores significativamente superiores à contagem de microrganismos totais viáveis a 36°C ($P = 0,0084$). Este resultado está em conformidade com o que seria esperado, uma vez que a maioria dos microrganismos existentes nos produtos hortofrutícolas e que podem contaminar as embalagens, são microrganismos mesófilos, ou então psicrófilos (Babesí *et al*, 2006).

A análise estatística dos resultados (ANOVA), mostra ainda que não existem diferenças significativas na contagem de microrganismos totais viáveis entre caixas que continham produtos hortícolas e caixas que continham frutos, quer a 22°C ($P = 0,14$), quer a 36°C ($P = 0,24$), embora, de acordo com Abadias *et al* (2008), os produtos hortícolas apresentem uma maior contagem de microrganismos totais viáveis do que os produtos frutícolas. Não se verificaram também diferenças na contagem de microrganismos totais viáveis entre épocas do ano ($P = 0,065$, 22°C; $P = 0,53$, 36°C).

O quadro 4.2 e a figura 4.2 apresentam os resultados obtidos referentes à contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C, nas amostras recolhidas no MARL.

Quadro 4.2: Contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.

Data de Colheita	Alimento	Material	Bolores e Leveduras a 25°C	Bolores e Leveduras a 37°C
07-12-07	Maçã	Madeira	2,37	<1,35
	Uva	PEAD	3,01	1,54
	Tomate	Madeira	1,92	1,20
	Laranja	PEAD	4,40	<1,35
	Couve Coração	Madeira	5,66	3,76
	Couve Coração	PEAD	5,91	<1,14
23-01-08	Pêra	Madeira	3,10	<1,35
	Pêra	Plástico	3,91	<1,35
	Maçã	Madeira	4,10	<1,35
	Maçã	PEAD	3,45	<1,35
	Alface	Madeira	4,26	3,96
	Alface	PP	4,11	<1,35
	Nabiças	Madeira	3,92	1,40
	Nabiças	Plástico	2,29	<1,35
13-05-08	Nectarina	Plástico	1,61	<0,09
	Ameixa	Madeira	1,01	<-0,03
	Damasco	Madeira	2,40	1,73
	Ameixa	Plástico	1,77	0,25
	Tomate	Madeira	3,20	2,13
	Tomate	PEAD	1,26	<-0,04
	Courgette	Madeira	2,36	<1,21
	Courgette	Plástico	3,17	1,56
16-07-08	Maçã Reineta	PEAD	2,71	<0,71
	Maçã Reineta	Madeira	0,85	<0,85
	Limão	Madeira	1,36	<0,52
	Pêra	PEAD	3,24	<0,80
	Alperce	PEAD	2,50	<0,71
	Alperce	Madeira	2,29	<0,21
	Couve	Madeira	3,53	3,28
	Couve	Plástico	2,14	<0,25
	Couve	Madeira	3,54	2,89
	Couve	Plástico	2,66	<0,07

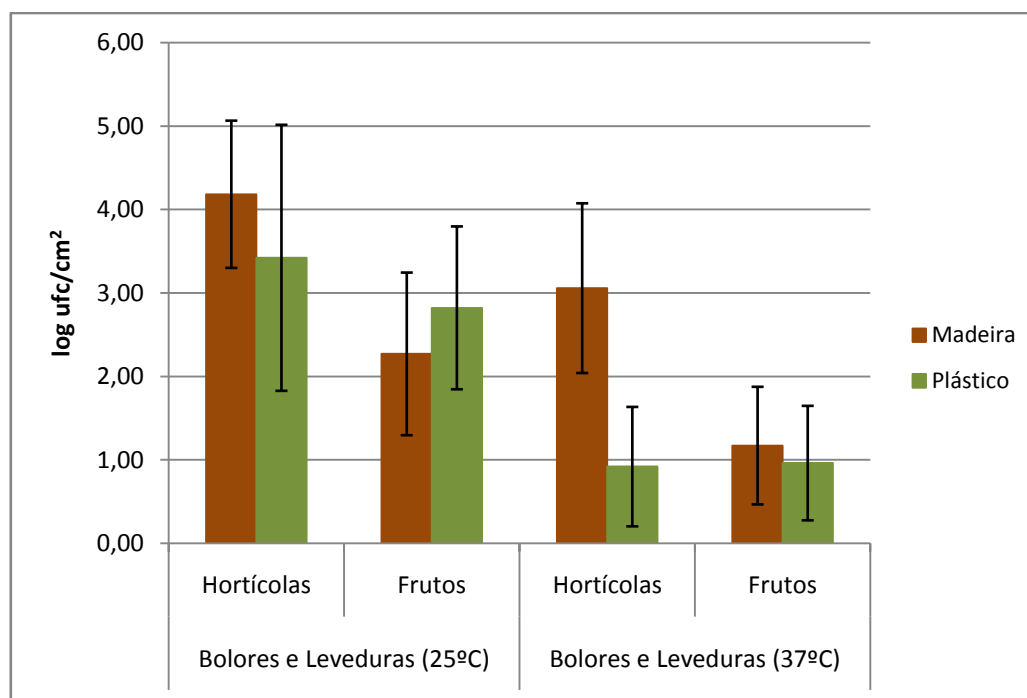


Figura 4.2: Contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.

Pela análise da figura 4.2, observa-se que a contagem de bolores e leveduras é geralmente superior na madeira do que no plástico, excepto para as caixas contendo frutos e à temperatura de incubação a 25°C. Verifica-se ainda que a contaminação com bolores e leveduras é sempre superior nas caixas que contêm hortícolas do que nas que contêm frutos, para ambas as temperaturas de incubação (25°C e 37°C). Estas diferenças entre tipo de produto acondicionado, são estatisticamente significativas na contagem de bolores e leveduras a 37°C ($P = 0,017$) e estatisticamente muito significativas na contagem de bolores e leveduras a 25°C ($P = 0,005$). Esta diferença na contagem em caixas contendo hortícolas e frutos pode resultar do tipo de produto acondicionado. De acordo com Abadias *et al.* (2008), os produtos hortícolas apresentam uma maior contagem de bolores e leveduras que os produtos frutícolas. Portanto, é natural que as caixas que acondicionam os produtos hortícolas apresentem também uma contaminação superior às caixas que acondicionam frutos.

Tendo em conta estas diferenças, ter-se-á de fazer a comparação entre os resultados obtidos para ambos os materiais, separadamente para frutos e hortícolas. No caso das embalagens que acondicionaram frutos, tal como referido anteriormente, na contagem a 25°C, o plástico evidenciou uma maior contaminação do que a madeira, ao contrário do observado na contagem a 37°C, em que foi a madeira a apresentar uma maior contaminação. Contudo, ambas as diferenças observadas não têm qualquer significado estatístico (25°C: $P = 0,20$; 37°C: $P = 0,49$).

Em relação às embalagens que acondicionaram produtos hortícolas, quer na contagem a 25°C, quer na contagem a 37°C, verificaram-se valores superiores de contaminação com

bolores e leveduras na madeira. Estas diferenças não foram significativas para a contagem a 25°C ($P = 0,38$), mas revelaram-se estatisticamente muito significativas para a contagem a 37°C ($P = 0,0049$).

Pode-se ainda observar que a contagem de bolores e leveduras a 25°C apresentou valores significativamente superiores à contagem de bolores e leveduras a 37°C ($P = 5,4 \times 10^{-7}$). Este resultado está em conformidade com o que seria esperado, uma vez que a maioria dos bolores e leveduras existentes nos produtos hortofrutícolas e que podem contaminar as embalagens, são microrganismos mesófilos, ou então psicrófilos (Babesi *et al*, 2006).

Em relação às diferenças observadas entre épocas do ano, verificou-se que nas caixas contendo frutos, a contagem foi sempre significativamente superior no Outono/Inverno do que na Primavera/Verão, a ambas temperaturas de incubação (25°C e 37°C) (25°C: $P = 0,0052$; 37°C: $P = 0,0033$; figura 4.3). Em relação às caixas contendo hortícolas, não se obtiveram diferenças significativas na contagem de bolores e leveduras, entre as diferentes épocas do ano (25°C: $P = 0,091$; 37°C: $P = 0,53$).

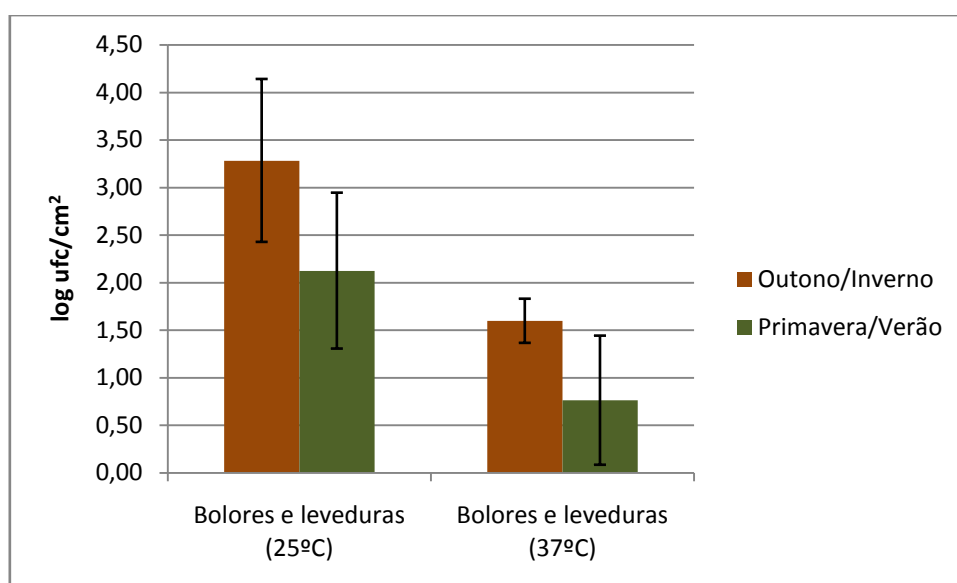


Figura 4.3: Contagem de bolores e leveduras a 25°C e 37°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas nas caixas contendo frutos, nas diversas colheitas realizadas no MARL.

O quadro 4.3 e a figura 4.4 apresentam os resultados obtidos referentes à contagem de bactérias coliformes e *E. coli*, nas amostras recolhidas no MARL.

Quadro 4.3: Contagem de bactérias coliformes e *E. coli* (log NMP/cm²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.

Data de Colheita	Alimento	Material	Bactérias coliformes	<i>E. coli</i>
07-12-07	Maçã	Madeira	<-0,82	<-0,82
	Uva	PEAD	-0,68	<-0,82
	Tomate	Madeira	-0,90	<-1,02
	Laranja	PEAD	0,35	0,35
	Couve Coração	Madeira	3,97	<-0,94
	Couve Coração	PEAD	2,82	<-1,08
23-01-08	Pêra	Madeira	<-0,82	<-0,82
	Pêra	Plástico	<-0,82	<-0,82
	Maçã	Madeira	<-0,82	<-0,82
	Maçã	PEAD	-0,22	<-0,82
	Alface	Madeira	1,78	<-1,11
	Alface	PP	-0,43	<-0,82
	Nabiças	Madeira	2,62	<-0,82
	Nabiças	Plástico	2,52	<-0,82
13-05-08	Nectarina	Plástico	-0,96	<-1,08
	Ameixa	Madeira	<-1,21	<-1,21
	Damasco	Madeira	2,51	<-0,98
	Ameixa	Plástico	-0,80	<-0,92
	Courgette	Madeira	<-0,96	<-0,96
	Courgette	Plástico	1,07	<-1,11
	Tomate	Madeira	<-0,96	<-0,96
	Tomate	PEAD	0,38	<-1,22
16-07-08	Maçã Reineta	PEAD	<-0,82	<-0,82
	Maçã Reineta	Madeira	<-0,82	<-0,82
	Limão	Madeira	<-0,82	<-0,82
	Pêra	PEAD	<-0,82	<-0,82
	Alperce	PEAD	<-0,82	<-0,82
	Alperce	Madeira	<-0,96	<-0,96
	Couve	Madeira	-0,08	<-0,96
	Couve	Plástico	-0,04	<-0,92
	Couve	Madeira	1,73	<-0,83
	Couve	Plástico	-0,63	<-1,10

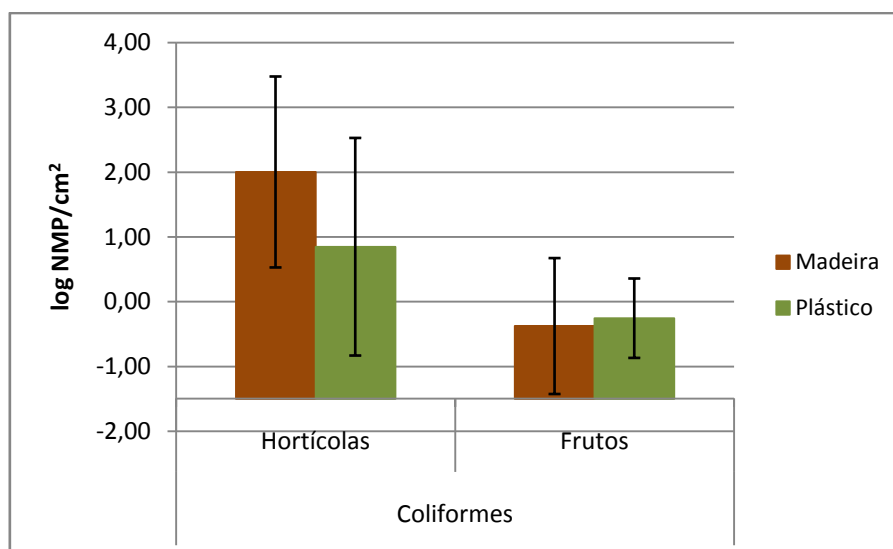


Figura 4.4: Contagem de bactérias coliformes (log NMP/cm²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.

Os resultados apresentados na figura 4.4 mostram que em relação à contagem de bactérias coliformes, este valor foi significativamente superior nas embalagens que acondicionavam hortícolas do que as embalagens que acondicionavam frutos ($P = 0,00034$). Estes resultados estão de acordo com o referenciado em Adams e Moss (1999) e em Abadias *et al.* (2008), que referem que os produtos hortícolas apresentam, geralmente, contagens de bactérias coliformes superiores às obtidas em produtos frutícolas. Em relação aos resultados obtidos na contagem de bactérias coliformes nas embalagens que acondicionavam produtos hortícolas, verificou-se que a contaminação das embalagens de madeira era superior à contaminação observada nas embalagens de plástico. No caso das embalagens que continham frutos, observou-se uma maior contaminação nas embalagens de plástico, face às de madeira. Contudo, as diferenças observadas não têm qualquer significado estatístico, quer para caixas com hortícolas ($P = 0,28$), quer para caixas com frutos ($P = 0,74$). Não se verificaram também diferenças na contagem de bactérias coliformes entre épocas do ano, quer nas caixas acondicionando hortícolas, quer nas caixas acondicionando frutos (Hortícolas: $P = 0,051$; Frutos: $P = 0,91$).

Em relação à contagem de *E. coli*, este microrganismo foi apenas detectado numa única amostra: numa embalagem de plástico contendo laranjas, na 1ª colheita.

O quadro 4.4 e a figura 4.5 apresentam os resultados obtidos referentes à contagem de enterococos, *C. perfringens*, *Pseudomonas* e *B. cereus*, nas amostras recolhidas no MARL.

Quadro 4.4: Contagem de enterococos, *C. perfringens*, *Pseudomonas* (log NMP/cm²) e *B. cereus* (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.

Data de Colheita	Alimento	Material	Enterococos	<i>C. Perfringens</i>	<i>Pseudo monas</i>	<i>B. cereus</i>
07-12-07	Maçã	Madeira	<-0,82	<-0,82	-0,19	-
	Uva	PEAD	<-0,82	0,20	-0,68	-
	Tomate	Madeira	-0,14	<-1,02	-0,14	-
	Laranja	PEAD	0,12	0,12	-0,64	-
	Couve Coração	Madeira	-0,94	-0,81	-0,05	-
	Couve Coração	PEAD	-0,60	-0,19	-0,19	-
23-01-08	Pêra	Madeira	<-0,82	-0,37	-0,02	<0,65
	Pêra	Plástico	<-0,82	-0,14	0,54	<0,65
	Maçã	Madeira	<-0,82	0,55	<-0,82	<0,65
	Maçã	PEAD	<-0,82	-0,10	<-0,82	<0,65
	Alface	Madeira	-0,22	-0,63	-0,98	<0,37
	Alface	PP	<-0,82	-0,56	-0,43	1,92
	Nabiças	Madeira	0,11	2,12	0,92	3,63
	Nabiças	Plástico	<-0,82	0,03	<-0,82	<0,65
13-05-08	Nectarina	Plástico	<-1,09	-0,20	-0,39	1,78
	Ameixa	Madeira	<-1,21	<-1,21	-0,51	<0,27
	Damasco	Madeira	<-0,98	<-0,98	-0,98	<0,49
	Ameixa	Plástico	0,23	-0,23	1,98	0,85
	Courgette	Madeira	-0,84	-0,60	1,94	<0,51
	Courgette	Plástico	-0,27	0,59	1,45	2,19
	Tomate	Madeira	-0,49	0,19	1,60	2,60
	Tomate	PEAD	<-1,22	0,27	0,63	<0,26
16-07-08	Maçã Reineta	PEAD	0,23	0,01	2,23	2,50
	Maçã Reineta	Madeira	<-0,82	-0,20	<-0,82	2,10
	Limão	Madeira	<-0,82	<-0,82	-0,29	1,90
	Pêra	PEAD	-0,26	0,10	0,10	2,14
	Alperce	PEAD	<-0,82	0,42	0,23	1,49
	Alperce	Madeira	<-0,96	<-0,96	0,04	1,42
	Couve	Madeira	-0,84	-0,49	0,94	0,81
	Couve	Plástico	-0,80	<-0,92	-0,56	<0,55
	Couve	Madeira	-0,36	0,05	0,05	1,60
	Couve	Plástico	-0,98	-0,22	-0,22	1,22

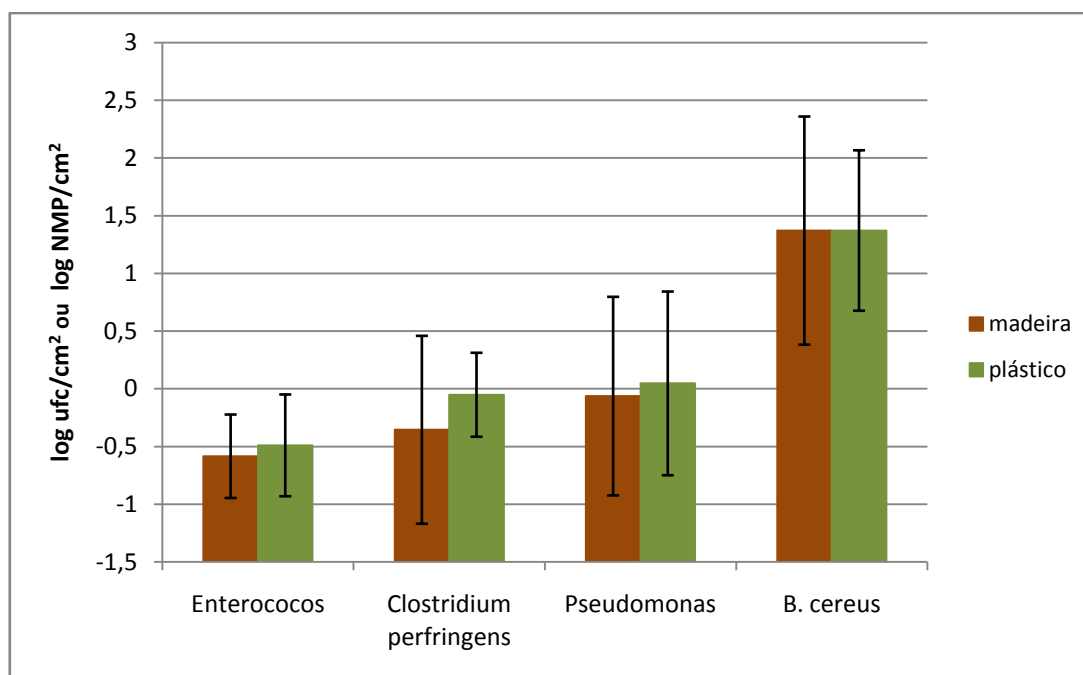


Figura 4.5: Contagem de enterococos, *C. perfringens*, *Pseudomonas* (log NMP/cm²) e *B. cereus* (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.

Em relação a este conjunto de microrganismos pesquisados e enumerados, verifica-se que a maior contaminação das embalagens se deveu a *B. cereus*, sendo esta contaminação significativamente superior à obtida na contagem dos restantes microrganismos. A contagem de *Pseudomonas* foi superior à de *Clostridium*, a qual, por sua vez, foi superior à contagem de enterococos. No entanto, estas diferenças não são estatisticamente significativas.

Pela análise do gráfico verifica-se que a contaminação com *B. cereus* é idêntica nos dois tipos de embalagens (madeira e plástico). Em relação à contaminação com enterococos, *Clostridium* e *Pseudomonas*, verificaram-se valores superiores nas embalagens de plástico. No entanto, a análise estatística destes resultados permite concluir que não se observaram diferenças significativas entre embalagens de madeira e de plástico, em termos da sua contaminação com enterococos ($P = 0,51$), *C. perfringens* ($P = 0,18$), *Pseudomonas* ($P = 0,77$) e *B. cereus* ($P = 1,00$). A análise estatística permite também concluir que não se observam diferenças significativas entre embalagens contendo frutos e hortícolas, em termos da sua contaminação com enterococos ($P = 0,65$), *C. perfringens* ($P = 0,81$), *Pseudomonas* ($P = 0,25$) e *B. cereus* ($P = 0,98$). Não se verificaram também diferenças na contagem de enterococos, *C. perfringens* e *B. cereus* entre épocas do ano (enterococos: $P = 0,16$; *C. perfringens*: $P = 0,45$; *B. cereus*: $P = 1,00$). Em relação às contagens de *Pseudomonas* obtiveram-se valores significativamente mais elevados na Primavera/Verão do que no Outono/Inverno ($P = 0,032$).

A figura 4.6, apresenta um gráfico comparativo das contagens de todos os microrganismos pesquisados e enumerados.

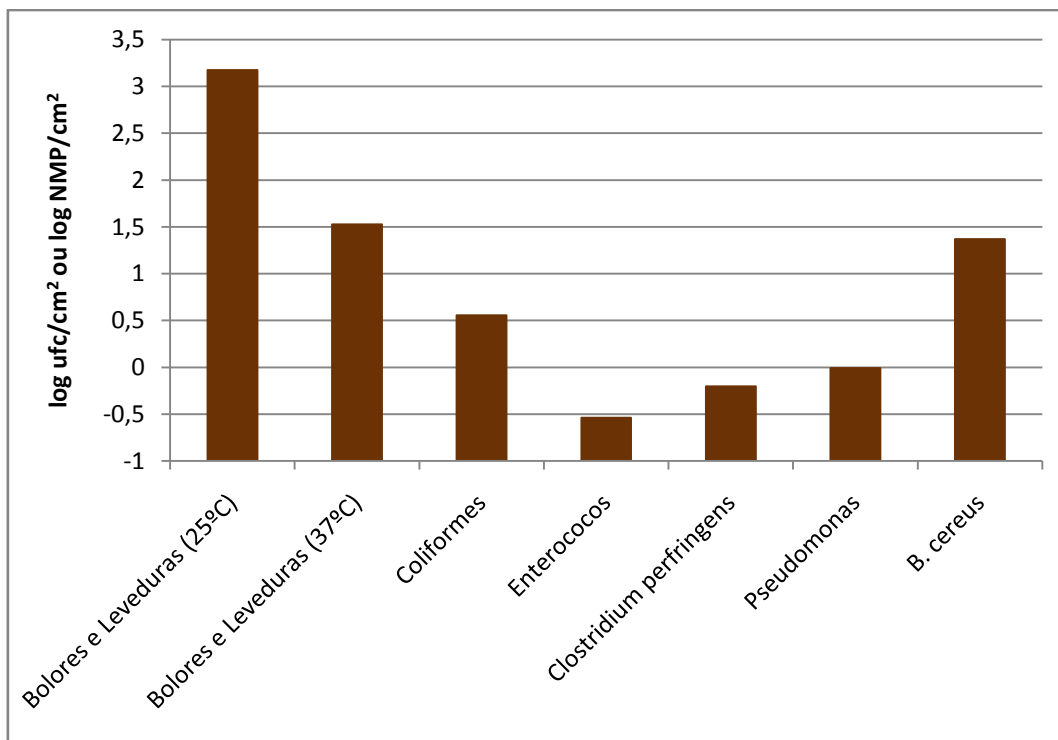


Figura 4.6: Contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C (log ufc/cm²), coliformes, enterococos, *C. perfringens*, *Pseudomonas* (log NMP/cm²) e *B. cereus* (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas nas diversas colheitas realizadas no MARL.

De acordo com a figura 4.6, a maior contaminação observada, nas caixas, contendo produtos hortofrutícolas, deveu-se a bolores e leveduras, a *B. cereus* e a bactérias coliformes (por ordem de grandeza). Estas contagens foram significativamente superiores às obtidas nas contagens dos restantes microrganismos (enterococos, *C. perfringens*, *Pseudomonas*).

4.2 Ensaio 2

O quadro 4.5 e a figura 4.7 apresentam os resultados obtidos referentes à contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C, nas amostras recolhidas ao longo de três meses, nas diversas condições ambientais.

Quadro 4.5: Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

Condições	Material	Dias e datas após início do ensaio			
		1 31 Março	31 30 Abril	61 30 Maio	94 2 Julho
C1: 4-7°C 80-82% H	Madeira – Alto Minho	1,90	1,55	1,74	1,29
	Madeira – Castelo de Paiva	1,84	2,23	1,01	1,45
	Madeira – Mealhada	2,08	1,23	0,58	1,23
	PEAD	3,60	3,27	1,88	1,71
	PP	2,08	1,65	0,60	0,72
C2: 20°C 55-60% H	Madeira – Alto Minho	2,26	0,92	2,82	1,83
	Madeira – Castelo de Paiva	2,58	3,09	2,90	2,02
	Madeira – Mealhada	2,27	1,53	1,82	1,70
	PEAD	3,70	2,96	2,01	1,37
	PP	2,71	1,33	1,80	1,40
C3: 15-30°C 50-80% H	Madeira – Alto Minho	2,44	1,78	2,77	2,59
	Madeira – Castelo de Paiva	2,94	1,89	2,36	2,58
	Madeira – Mealhada	2,37	1,59	2,72	2,05
	PEAD	3,81	2,78	2,53	2,25
	PP	3,04	1,67	3,63	2,64

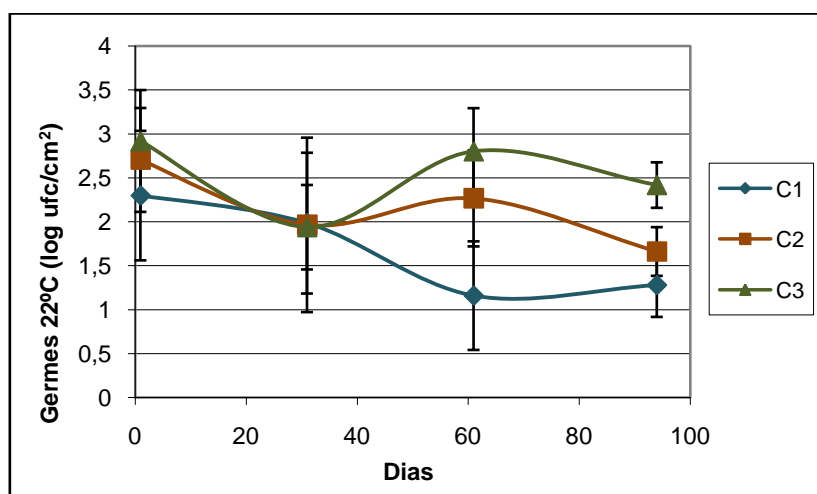


Figura 4.7: Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

De acordo com os dados apresentados no quadro 4.5 e na figura 4.7, verificou-se uma maior contaminação, em termos de microrganismos totais viáveis a 22°C, nas amostras recolhidas nas condições ambientais C3 (15-30°C, 50-80%H). Esta contaminação no final do ensaio foi significativamente superior ($P = 0,0002$) à contaminação verificada nas amostras recolhidas nas condições ambientais C1 (4-7°C, 80-82%H) e C2 (20°C, 55-60%H). Atendendo a que estas amostras foram colocadas em ambiente exterior e, portanto, sujeitas a uma maior contaminação ambiental, os resultados obtidos vêm confirmar o que em termos de contaminação microbiana seria previsto. A análise estatística dos resultados (ANOVA), mostra ainda que não existem diferenças significativas na contagem de microrganismos totais viáveis entre materiais de madeira e de plástico ($P = 0,57$), bem como entre os diferentes tipos de proveniências de madeiras ($P = 0,74$) e os diferentes tipos de plástico ($P = 0,77$). De acordo com todos estes resultados, pode então afirmar-se que para as diversas condições ambientais estudadas não se verificou que a madeira possa ser mais susceptível a contaminação do que o plástico.

O quadro 4.6 e a figura 4.8 apresentam os resultados obtidos referentes à contagem de microrganismos totais viáveis a 36°C, nas amostras recolhidas ao longo de três meses, nas diversas condições ambientais.

Quadro 4.6: Contagem de microrganismos totais viáveis a 36°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

Condições	Material	Dias e datas após início do ensaio			
		1 31 Março	31 30 Abril	61 30 Maio	94 2 Julho
C1: 4-7°C 80-82%H	Madeira – Alto Minho	1,20	0,25	1,51	1,09
	Madeira – Castelo de Paiva	1,68	1,66	1,41	0,71
	Madeira – Mealhada	1,54	2,12	1,87	1,12
	PEAD	1,52	1,90	1,06	1,60
	PP	2,16	0,97	1,70	0,60
C2: 20°C 55-60%H	Madeira – Alto Minho	1,76	1,00	2,14	1,46
	Madeira – Castelo de Paiva	2,13	1,53	1,39	1,63
	Madeira – Mealhada	1,76	1,18	1,07	1,07
	PEAD	1,66	1,44	0,81	0,81
	PP	2,53	1,40	0,94	1,33
C3: 15-30°C 50-80%H	Madeira – Alto Minho	1,97	1,77	0,98	1,37
	Madeira – Castelo de Paiva	2,42	1,53	1,34	1,97
	Madeira – Mealhada	1,87	1,35	1,53	1,93
	PEAD	1,98	1,52	0,82	1,04
	PP	2,86	1,43	0,97	1,03

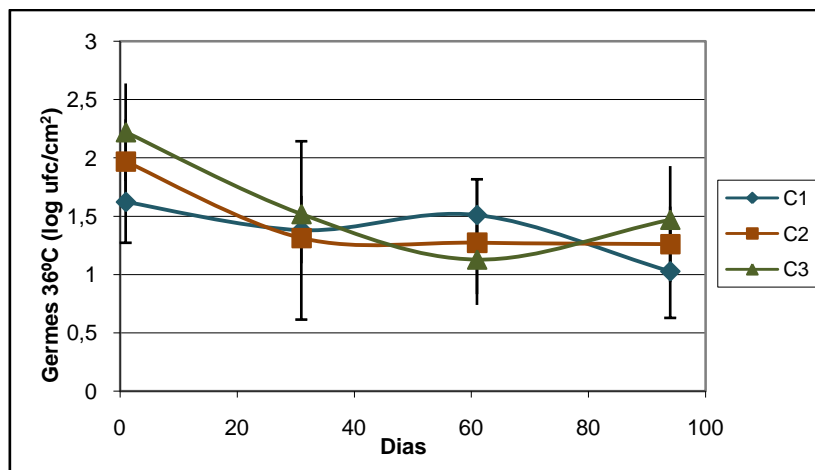


Figura 4.8: Contagem de microrganismos totais viáveis a 36°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

De acordo com os dados apresentados no quadro 4.6 e na figura 4.8, em termos de microrganismos totais viáveis a 36°C, não se verificaram diferenças significativas entre as contagens efectuadas nas amostras recolhidas nas diferentes condições ambientais ($P = 0,25$). A análise estatística dos resultados (ANOVA), mostra ainda que não existem diferenças significativas na contagem de microrganismos totais viáveis entre materiais de madeira e de plástico ($P = 0,17$), bem como entre os diferentes tipos de proveniências de madeiras ($P = 0,95$) e os diferentes tipos de plástico ($P = 0,63$).

De acordo com os resultados dos quadros 4.5 e 4.6, pode então afirmar-se que para as diversas condições ambientais estudadas não se verificou que a madeira possa ser mais susceptível à contaminação do que o plástico (figura 4.9).

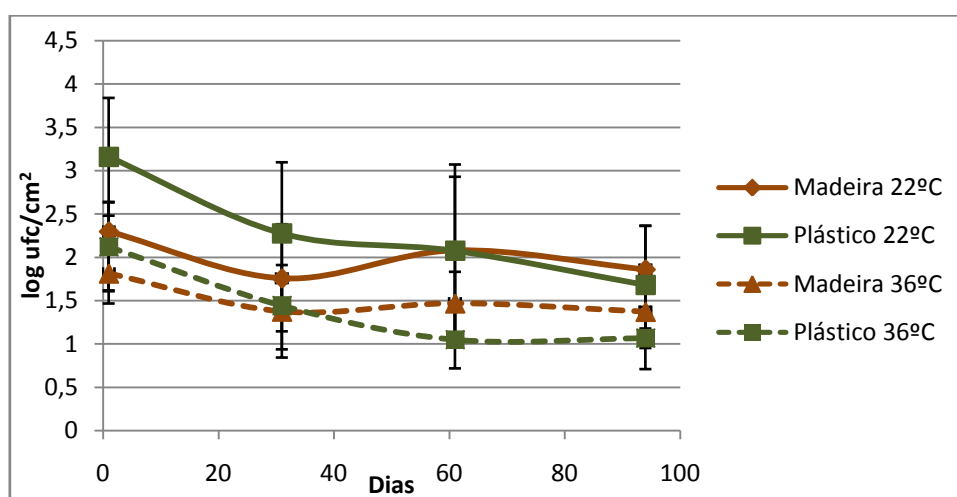


Figura 4.9: Contagem de microrganismos totais viáveis a 22 °C e a 36°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais, nos dois tipos de materiais (madeira e plástico).

Analisando os dados dos quadros 4.5 e 4.6, pode-se ainda observar que a contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C apresentou valores significativamente superiores à

contagem de microrganismos totais viáveis a 36°C ($P = 0,006$). A figura 4.10 mostra a evolução da contaminação ao longo dos três meses, em termos da contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C. De acordo com estes resultados, pode então afirmar-se que nas diversas condições ambientais estudadas, quer o plástico, quer a madeira apresentaram uma maior contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C.

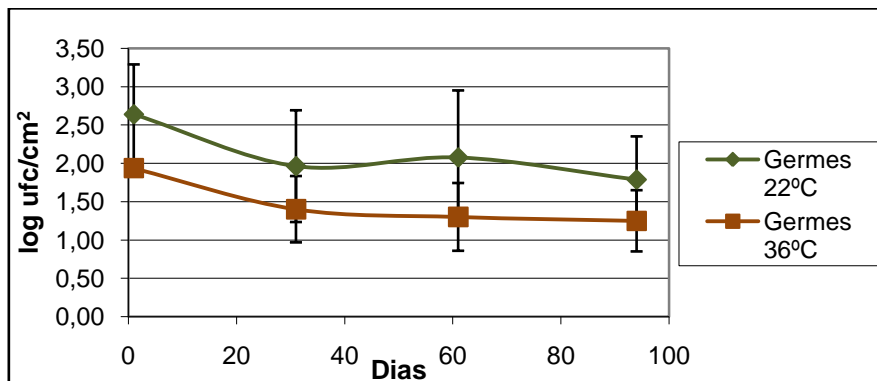


Figura 4.10: Comparação da contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses.

Os quadros 4.7 e 4.8 e a figura 4.11 apresentam os resultados obtidos referentes à contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C, nas amostras recolhidas ao longo de três meses, nas diversas condições ambientais.

Quadro 4.7: Contagem de bolores e leveduras a 25°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

Condições	Material	Dias e datas após início do ensaio			
		1 31 Março	31 30 Abril	61 30 Maio	94 2 Julho
C1: 4-7°C 80-82% H	Madeira – Alto Minho	1,53	<0,40	<0,40	<0,40
	Madeira – Castelo de Paiva	1,55	<0,40	<0,40	<0,40
	Madeira – Mealhada	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
	PEAD	3,33	2,93	<0,40	<0,40
	PP	1,68	<0,40	<0,40	<0,40
C2: 20°C 55-60% H	Madeira – Alto Minho	2,06	<0,40	<0,40	1,23
	Madeira – Castelo de Paiva	2,07	2,95	2,83	1,53
	Madeira – Mealhada	1,37	1,18	0,93	0,93
	PEAD	3,17	1,59	0,73	<0,40
	PP	1,85	<0,40	0,80	1,10
C3: 15-30°C 50-80% H	Madeira – Alto Minho	2,30	1,45	1,75	0,90
	Madeira – Castelo de Paiva	2,34	<0,40	1,64	2,04
	Madeira – Mealhada	1,53	1,43	1,91	1,35
	PEAD	3,01	1,47	0,74	0,74
	PP	2,18	0,83	1,68	1,13

Quadro 4.8: Contagem de bolores e leveduras a 37°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

Condições	Material	Dias e datas após início do ensaio			
		1 31 Março	31 30 Abril	61 30 Maio	94 2 Julho
C1: 4-7°C 80-82%H	Madeira – Alto Minho	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
	Madeira – Castelo de Paiva	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
	Madeira – Mealhada	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
	PEAD	1,17	<0,40	<0,40	<0,40
	PP	1,48	<0,40	<0,40	<0,40
C2: 20°C 55-60%H	Madeira – Alto Minho	1,59	<0,40	<0,40	<0,40
	Madeira – Castelo de Paiva	1,71	1,05	<0,40	<0,40
	Madeira – Mealhada	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
	PEAD	1,48	0,98	<0,40	<0,40
	PP	1,86	<0,40	<0,40	<0,40
C3: 15-30°C 50-80%H	Madeira – Alto Minho	1,56	<0,40	<0,40	<0,40
	Madeira – Castelo de Paiva	1,74	<0,40	<0,40	<0,40
	Madeira – Mealhada	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
	PEAD	1,59	<0,40	<0,40	<0,40
	PP	2,26	<0,40	<0,40	<0,40

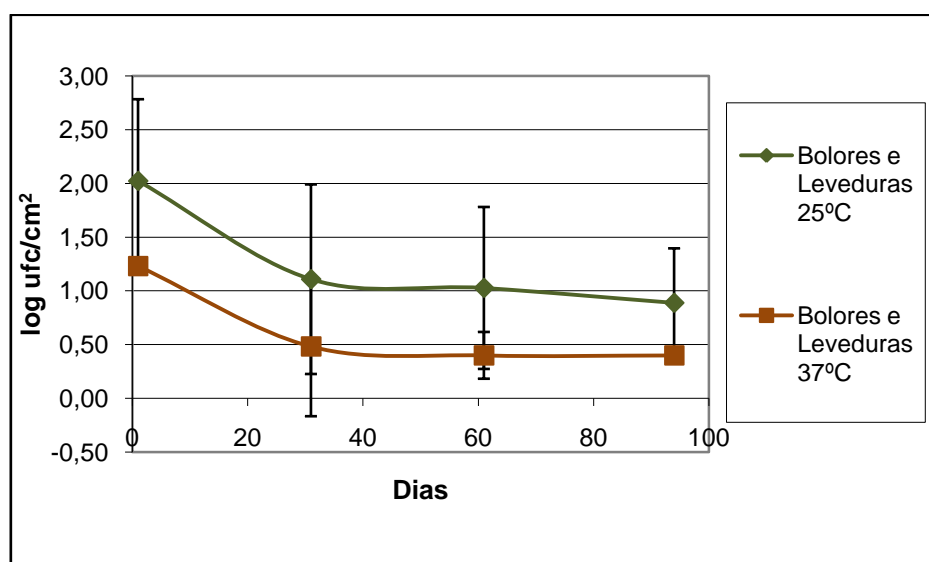


Figura 4.11: Comparação da contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses.

De acordo com os dados apresentados, em termos de contagem de bolores e leveduras a 25°C, não se verificaram diferenças significativas entre os resultados obtidos nas amostras recolhidas nas diferentes condições ambientais ($P = 0,40$). A análise estatística

dos resultados (ANOVA), mostra ainda que não existem diferenças significativas na contagem de bolores e leveduras a 25°C entre materiais de madeira e de plástico ($P = 0,06$), bem como entre os diferentes tipos de proveniências de madeiras ($P = 0,16$) e os diferentes tipos de plástico ($P = 0,05$). De acordo com os dados apresentados, em termos de contagem de bolores e leveduras a 37°C, a partir do final do segundo mês, não foram detectados bolores e leveduras nesta temperatura, em todas as amostras recolhidas, não se observando diferenças em termos de materiais e de condições ambientais. Verifica-se, mais uma vez, que nas diversas condições ambientais estudadas a madeira não se apresentou como sendo um material mais susceptível à contaminação do que o plástico, para os microrganismos pesquisados (figura 4.12). Analisando os dados dos quadros 4.7 e 4.8, pode-se ainda observar que a contagem de bolores e leveduras a 25°C apresentou valores superiores à contagem de bolores e leveduras a 37°C, no entanto, esta diferença não é estatisticamente significativa ($P = 0,06$).

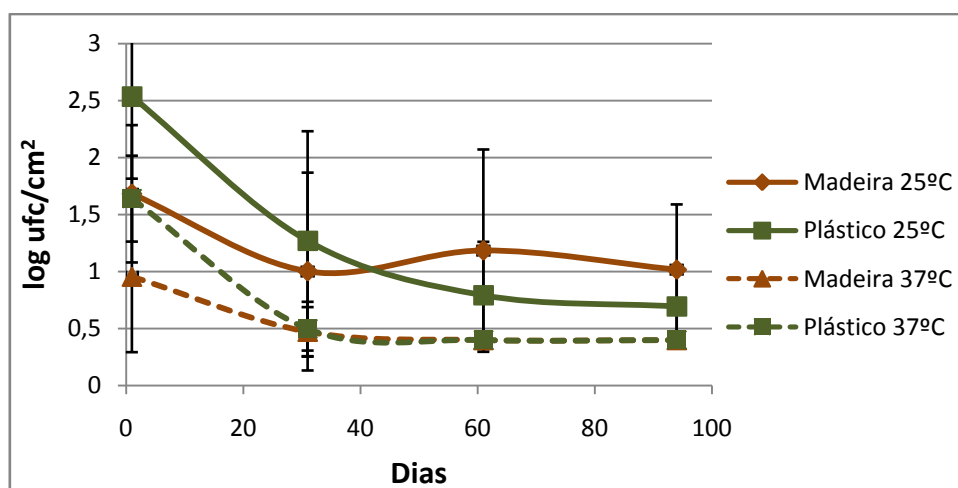


Figura 4.12: Contagem de bolores e leveduras a 25 °C e a 37°C (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais, nos dois tipos de materiais (madeira e plástico).

O quadro 4.9 apresenta os resultados obtidos referentes à contagem de bactérias coliformes, nas amostras recolhidas ao longo de três meses, nas diversas condições ambientais.

Quadro 4.9: Contagem de bactérias coliformes (log NMP/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

Condições	Material	Dias e datas após início do ensaio			
		1 31 Março	31 30 Abril	61 30 Maio	94 2 Julho
C1: 4-7°C 80-82%H	Madeira – Alto Minho	-1,15	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Castelo de Paiva	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Mealhada	-1,12	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	PEAD	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	PP	<-1,82	-1,40	<-1,82	<-1,82
C2: 20°C 55-60%H	Madeira – Alto Minho	-0,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Castelo de Paiva	-0,01	-0,69	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Mealhada	-0,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	PEAD	-1,12	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	PP	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
C3: 15-30°C 50-80%H	Madeira – Alto Minho	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Castelo de Paiva	-0,26	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Mealhada	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	PEAD	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	PP	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82

De acordo com os dados apresentados, em termos de contagem de bactérias coliformes, a partir do final do segundo mês, não foram detectados coliformes, em todas as amostras recolhidas, não se observando diferenças em termos de materiais e de condições ambientais. Verifica-se, mais uma vez, que nas diversas condições ambientais estudadas a madeira não se apresentou como sendo um material mais susceptível à contaminação do que o plástico, para os microrganismos pesquisados. Na pesquisa e contagem de *E. coli*, em todas as amostras recolhidas, nunca foi detectada a presença desta bactéria.

Os quadros 4.10 a 4.13 e as figuras 4.13 a 4.15 apresentam os resultados obtidos referentes à contagem de enterococos, *C. perfringens*, *Pseudomonas* e *B. cereus*, nas amostras recolhidas ao longo de três meses, nas diversas condições ambientais.

Quadro 4.10: Contagem de Enterococos (log NMP/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

Condições	Material	Dias e datas após início do ensaio			
		1 31 Março	31 30 Abril	61 30 Maio	94 2 Julho
C1: 4-7°C 80-82%H	Madeira – Alto Minho	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Castelo de Paiva	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Mealhada	<-1,82	<-1,82	-1,12	<-1,82
	PEAD	-1,46	<-1,82	-1,34	-1,34
	PP	<-1,82	-1,40	<-1,82	<-1,82
C2: 20°C 55-60%H	Madeira – Alto Minho	<-1,82	-1,30	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Castelo de Paiva	<-1,82	<-1,82	-1,05	<-1,82
	Madeira – Mealhada	<-1,82	<-1,82	<-1,82	-1,17
	PEAD	<-1,82	<-1,82	-1,37	<-1,82
	PP	-1,06	-1,43	<-1,82	-1,30
C3: 15-30°C 50-80%H	Madeira – Alto Minho	<-1,82	<-1,82	<-1,82	-0,85
	Madeira – Castelo de Paiva	<-1,82	<-1,82	<-1,82	-1,01
	Madeira – Mealhada	<-1,82	<-1,82	-1,23	<-1,82
	PEAD	-1,48	<-1,82	<-1,82	-1,00
	PP	<-1,82	<-1,82	<-1,82	-0,92

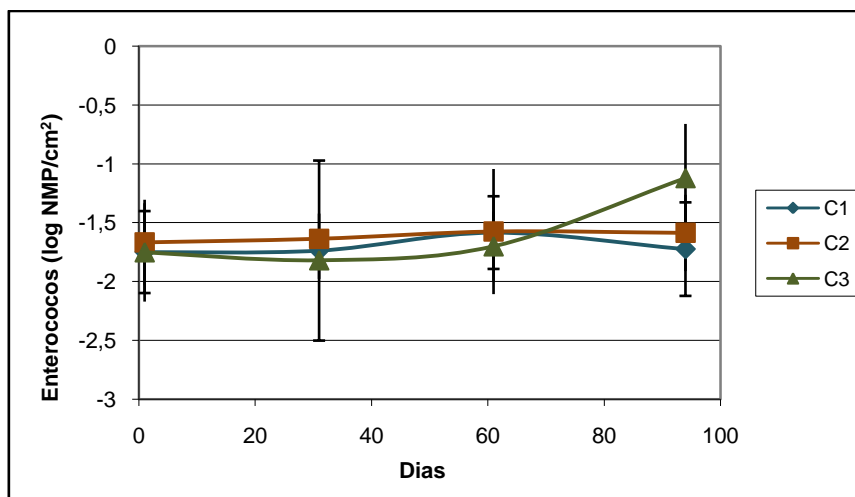


Figura 4.13: Contagem de enterococos (log NMP/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

Quadro 4.11: Contagem de *C. perfringens* (log NMP/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

Condições	Material	Dias e datas após início do ensaio			
		1 31 Março	31 30 Abril	61 30 Maio	94 2 Julho
C1: 4-7°C 80-82%H	Madeira – Alto Minho	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Castelo de Paiva	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Mealhada	-1,24	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	PEAD	0,44	<-1,82	-0,99	<-1,82
	PP	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
C2: 20°C 55-60%H	Madeira – Alto Minho	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Castelo de Paiva	<-1,82	<-1,82	<-1,82	<-1,82
	Madeira – Mealhada	<-1,82	-0,82	<-1,82	-1,17
	PEAD	0,41	-0,61	<-1,82	<-1,82
	PP	-0,52	<-1,82	<-1,82	-1,30
C3: 15-30°C 50-80%H	Madeira – Alto Minho	<-1,82	<-1,82	<-1,82	-0,44
	Madeira – Castelo de Paiva	<-1,82	<-1,82	<-1,82	-1,01
	Madeira – Mealhada	<-1,82	-1,23	-0,87	-1,23
	PEAD	0,42	0,42	-1,35	-0,60
	PP	-0,49	<-1,82	<-1,82	-0,51

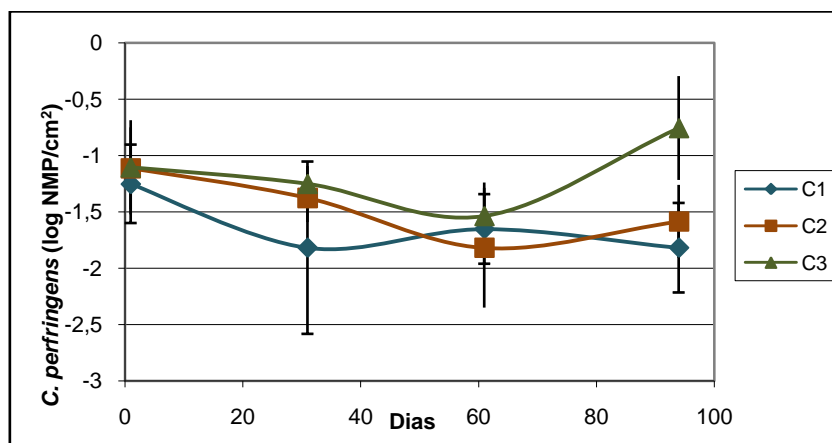


Figura 4.14: Contagem de *C. perfringens* (log NMP/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

Quadro 4.12: Contagem de *Pseudomonas* (log NMP/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

Condições	Material	Dias e datas após início do ensaio			
		1 31 Março	31 30 Abril	61 30 Maio	94 2 Julho
C1: 4-7°C 80-82%H	Madeira – Alto Minho	<-1,82	<-1,82	-0,39	-1,27
	Madeira – Castelo de Paiva	-0,64	-1,12	-0,99	-0,64
	Madeira – Mealhada	<-1,82	<-1,82	-0,36	-1,12
	PEAD	-0,07	0,44	-0,58	-0,31
	PP	-0,24	-1,28	-0,92	-1,28
C2: 20°C 55-60%H	Madeira – Alto Minho	-1,30	<-1,82	<-1,82	-0,41
	Madeira – Castelo de Paiva	<-1,82	-0,69	-0,69	-0,01
	Madeira – Mealhada	<-1,82	-1,17	-1,17	-1,17
	PEAD	-0,67	0,41	0,00	-0,79
	PP	-1,43	-0,54	<-1,82	-0,95
C3: 15-30°C 50-80%H	Madeira – Alto Minho	<-1,82	-0,44	0,58	0,37
	Madeira – Castelo de Paiva	<-1,82	-0,26	-0,26	0,02
	Madeira – Mealhada	<-1,82	-0,71	-0,19	-0,19
	PEAD	-0,32	0,42	0,42	0,00
	PP	<-1,82	-0,24	0,51	0,08

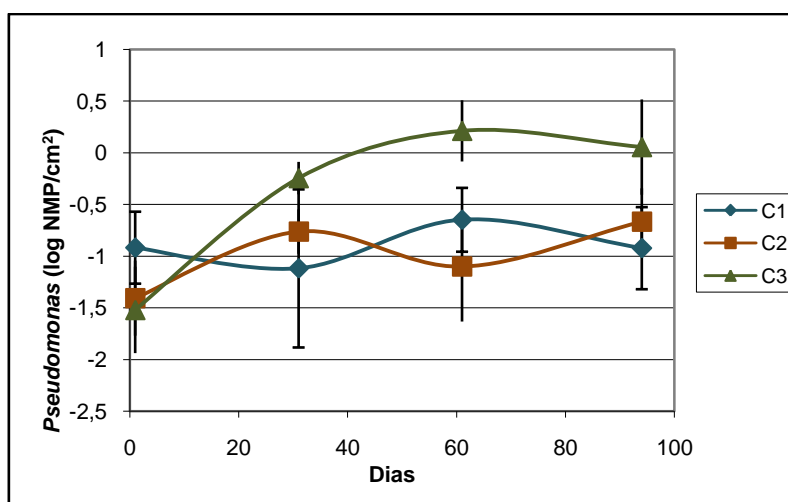


Figura 4.15: Contagem de *Pseudomonas* (log NMP/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

De acordo com os dados apresentados, verificou-se uma maior contaminação, em termos de enterococos, *C. perfringens* e *Pseudomonas*, nas amostras recolhidas nas condições ambientais C3 (15-30°C, 50-80% H) (figuras 4.13 a 4.15). Esta contaminação no final do ensaio foi significativamente superior à contaminação verificada nas amostras recolhidas nas condições ambientais C1 (4-7°C, 80-82% H) e C2 (20°C, 55-60% H) ($P_{\text{enterococos}} = 0,028$; $P_{C. \text{perfringens}} = 0,0036$; $P_{Pseudomonas} = 0,0044$). Em relação à

contaminação por *B. cereus*, não se verificaram diferenças significativas devido às condições ambientais ($P = 0,47$). A análise estatística dos resultados (ANOVA), mostra ainda que não existem diferenças significativas na contagem de enterococos, *C. perfringens*, *Pseudomonas* e *B. cereus* entre materiais de madeira e de plástico ($P_{\text{enterococos}} = 0,45$; $P_{C. \text{perfringens}} = 0,91$; $P_{Pseudomonas} = 0,87$; $P_{B. \text{cereus}} = 1,0$). Para as diversas condições ambientais estudadas não se verificou, portanto, que a madeira possa ser mais susceptível à contaminação do que o plástico, para estes microrganismos estudados (figuras 4.16 e 4.17).

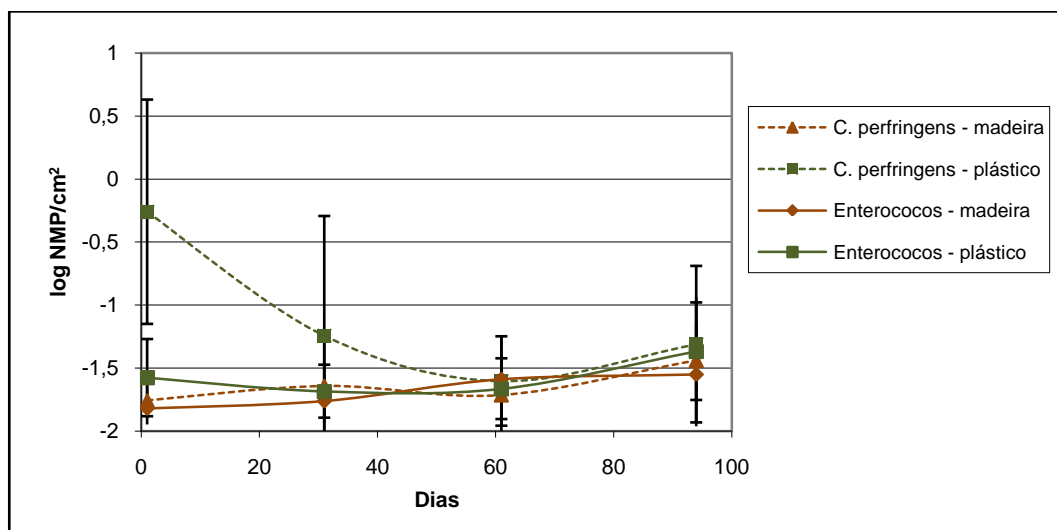


Figura 4.16: Contagem de Enterococos e *Clostridium perfringens* (log NMP/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais, nos dois tipos de materiais (madeira e plástico).

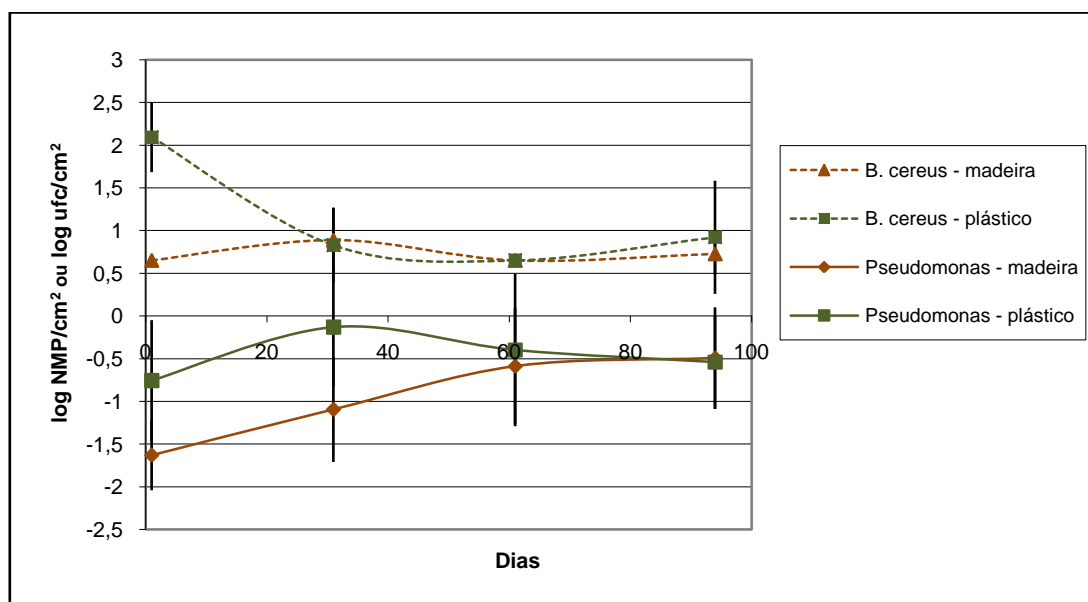


Figura 4.17: Contagem de *Pseudomonas* (log NMP/cm²) e *Bacillus cereus* (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais, nos dois tipos de materiais (madeira e plástico).

Quadro 4.13: Contagem de *B. cereus* (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses nas diversas condições ambientais.

Condições	Material	Dias e datas após início do ensaio			
		1 31 Março	31 30 Abril	61 30 Maio	94 2 Julho
C1: 4-7°C 80-82%H	Madeira – Alto Minho	<0,65	1,20	<0,65	<0,65
	Madeira – Castelo de Paiva	<0,65	1,66	<0,65	<0,65
	Madeira – Mealhada	<0,65	1,23	<0,65	<0,65
	PEAD	2,37	1,71	<0,65	<0,65
	PP	1,40	<0,65	<0,65	<0,65
C2: 20°C 55-60%H	Madeira – Alto Minho	<0,65	<0,65	<0,65	<0,65
	Madeira – Castelo de Paiva	<0,65	<0,65	<0,65	<0,65
	Madeira – Mealhada	<0,65	<0,65	<0,65	<0,65
	PEAD	2,39	<0,65	<0,65	<0,65
	PP	1,83	<0,65	<0,65	<0,65
C3: 15-30°C 50-80%H	Madeira – Alto Minho	<0,65	<0,65	<0,65	<0,65
	Madeira – Castelo de Paiva	<0,65	<0,65	<0,65	1,34
	Madeira – Mealhada	<0,65	<0,65	<0,65	<0,65
	PEAD	2,44	<0,65	<0,65	<0,65
	PP	2,12	<0,65	<0,65	2,27

Não se verificaram diferenças entre diferentes tipos de plástico para a contaminação com enterococos, *C. perfringens*, *Pseudomonas* e *B. cereus* ($P_{\text{enterococos}} = 0,75$; $P_{C. perfringens} = 0,80$; $P_{Pseudomonas} = 0,50$; $P_{B.cereus} = 0,31$), nem entre diferentes tipos de proveniências de madeiras ($P_{\text{enterococos}} = 0,52$; $P_{C. perfringens} = 0,69$; $P_{Pseudomonas} = 0,50$) para a contaminação com enterococos, *C. perfringens* e *Pseudomonas*. Verificou-se que em termos de contagem de *B. cereus*, a madeira proveniente de Castelo de Paiva apresentou no final do ensaio uma contaminação significativamente superior à contaminação observada nas madeiras provenientes do Alto Minho e da Mealhada ($P = 0,0034$) (figura 4.18). Uma vez que as madeiras tinham todas o mesmo tipo de tratamento, esta diferença pode dever-se à origem da madeira. No entanto, as madeiras provenientes de Castelo de Paiva, são utilizadas para fazer os cantos das caixas e portanto, são serradas ao meio, após o tratamento efectuado para a higienização e preservação da madeira (Pico, 2008). Devido a este facto, a parte serrada, como não foi previamente exposta a tratamento está mais susceptível à contaminação e degradação.

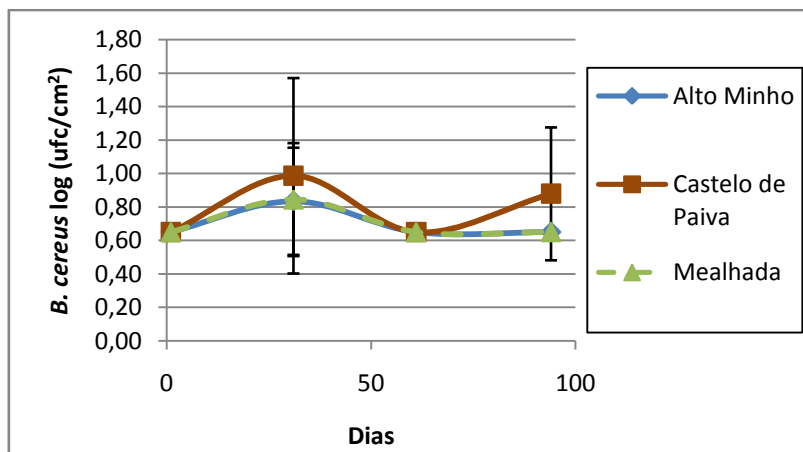


Figura 4.18: Comparação entre madeiras de diferentes proveniências, em termos de contagem de *B. cereus* (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses.

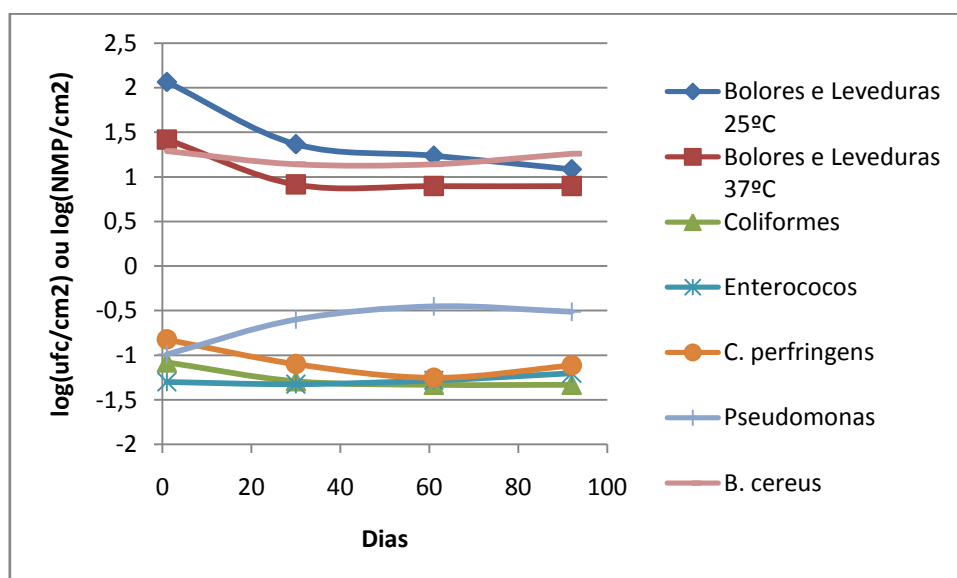


Figura 4.19: Contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C (log ufc/cm²), coliformes, enterococos, *C. perfringens*, *Pseudomonas* (log NMP/cm²) e *B. cereus* (log ufc/cm²), nas amostras recolhidas ao longo de três meses.

De acordo com a figura 4.19, a maior contaminação observada, nos materiais em estudo (madeira e plástico), deveu-se a bolores e leveduras e a *B. cereus*. Estas contagens foram significativamente superiores às obtidas nas contagens dos restantes microrganismos (coliformes, enterococos, *C. perfringens* e *Pseudomonas*). Na maior parte das contagens efectuadas verificou-se um decréscimo da contaminação ao longo do tempo, excepto para a contagem de *pseudomonas*, em que se verificou um crescimento no início do ensaio.

4.3 Ensaio 3

4.3.1 Contaminação com Bolores e Leveduras

Neste estudo, os materiais a experimentar foram inoculados com uma cultura de bolores e leveduras contendo $2,8 \times 10^4$ ufc/ml. Após a inoculação dos materiais, estudou-se a evolução da carga microbiana (bolores e leveduras) nestes.

Os quadros 4.14 e 4.15 e as figuras 4.20 e 4.21 apresentam os resultados obtidos referentes à evolução da contaminação dos materiais com bolores e leveduras a 7°C e a 20°C, respectivamente, ao longo do tempo de ensaio (cerca de 20 dias).

Quadro 4.14: Evolução da Contaminação com bolores e leveduras nos materiais em estudo, ao longo do tempo, no ensaio efectuado a 7°C (log ufc/cm²).

MATERIAIS		DIAS APÓS INOCULAÇÃO							
		1	3	4	8	10	12	15	17
ALTO MINHO	7 – 10%H	1,80	0,37	1,10	0,37	1,62	3,29	5,24	4,86
	20 – 25%H	1,61	0,91	1,21	4,30	4,06	4,13	5,03	5,83
CASTELO DE PAIVA	7 – 10%H	3,18	1,22	0,49	3,56	2,29	3,79	4,07	4,69
	20 – 25%H	1,59	2,36	3,43	4,72	4,96	4,85	5,41	5,32
MEALHADA	7 – 10%H	1,04	0,59	1,59	4,05	2,55	3,68	5,10	4,56
	20 – 25%H	2,15	0,50	1,40	4,25	5,00	4,99	5,39	5,02
PP		1,81	0,62	1,10	3,72	1,62	0,92	0,36	0,36
PEAD		1,93	2,62	1,09	3,84	1,38	0,87	0,68	0,43

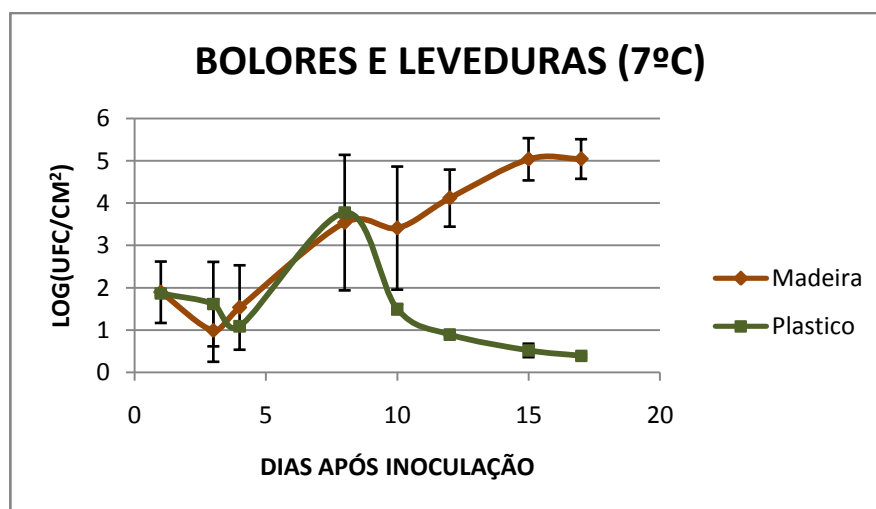


Figura 4.20: Evolução da contaminação com bolores e leveduras nos materiais em estudo a 7°C, ao longo do tempo.

Quando os materiais são incubados a 7°C, observa-se inicialmente uma diminuição da carga microbiana e depois um desenvolvimento e crescimento dos fungos e leveduras em todos os materiais. No entanto, a partir do 8º dia, verifica-se que no plástico a carga microbiana diminui significativamente, enquanto que na madeira, os bolores e leveduras continuam em crescimento. Até ao fim do ensaio (17 dias), verifica-se que o teor em bolores e leveduras nas madeiras é significativamente superior ao dos plásticos ($P = 0,00038$).

Quadro 4.15: Evolução da Contaminação com bolores e leveduras nos materiais em estudo, ao longo do tempo, no ensaio efectuado a 20°C (log ufc/cm²)

		DIAS APÓS INOCULAÇÃO							
MATERIAIS		1	4	10	15	17	19	22	24
ALTO MINHO	7 – 10%H	3,84	4,86	5,18	5,22	4,81	5,23	5,18	5,07
	20 – 25%H	3,83	4,66	4,96	4,90	5,24	4,90	5,23	4,94
CASTELO DE PAIVA	7 – 10%H	4,02	4,74	4,62	4,79	4,98	5,16	4,19	4,69
	20 – 25%H	4,36	5,59	5,13	5,26	5,29	6,01	5,05	5,30
MEALHADA	7 – 10%H	4,30	5,51	4,93	5,24	5,03	5,32	5,06	5,02
	20 – 25%H	4,31	3,96	4,89	4,64	4,15	4,28	4,30	5,00
PP		3,48	3,22	1,32	1,10	0,84	0,27	0,27	0,27
PEAD		4,16	2,39	1,69	0,33	0,73	1,03	0,33	0,33

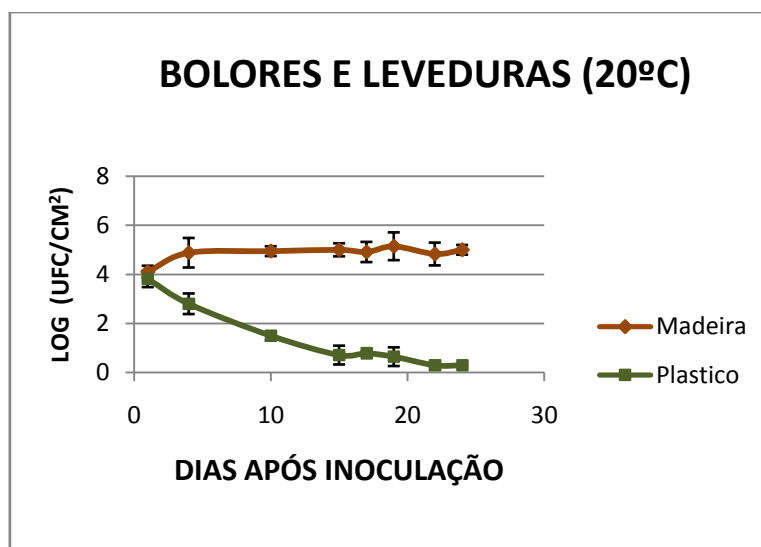


Figura 4.21: Evolução da contaminação com bolores e leveduras nos materiais em estudo a 20°C, ao longo do tempo.

Quando os materiais foram incubados a 20°C, observou-se uma diminuição da carga microbiana nos materiais de plástico, enquanto nos materiais de madeira se verifica um desenvolvimento e crescimento de bolores e leveduras que se mantém constante a partir do 4º dia. Ao longo do ensaio (24 dias), verificou-se que o teor de bolores e leveduras nas madeiras é significativamente superior ao dos plásticos ($P = 8,3 \times 10^{-24}$).

A figura 4.22 apresenta a comparação da evolução da contaminação com bolores e leveduras às diferentes temperaturas ensaiadas (7 °C e 20°C).

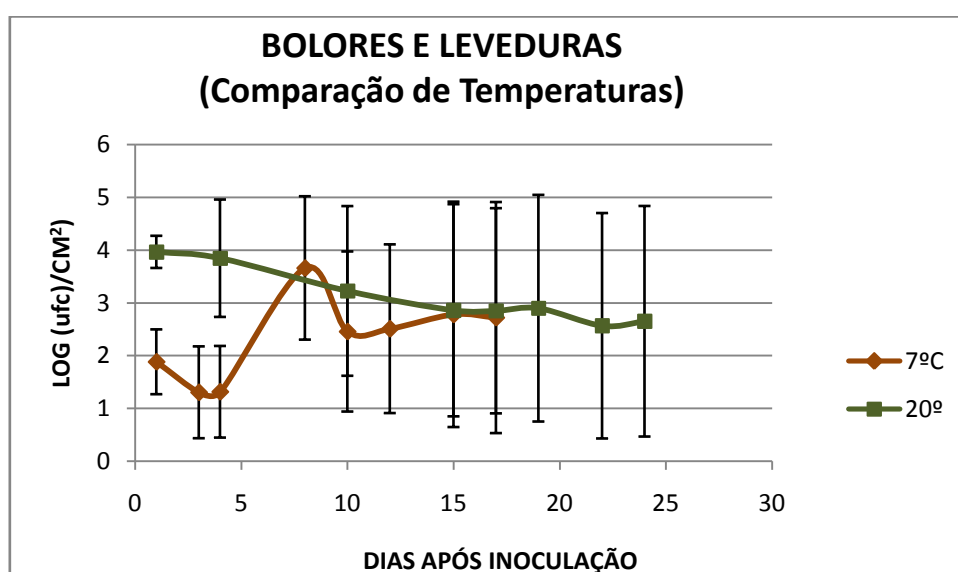


Figura 4.22: Comparação da evolução da contaminação com bolores e leveduras nos materiais em estudo (madeira e plástico) a diferentes temperaturas.

A análise da figura 4.22 mostra que, quando os materiais são incubados a 7°C, observa-se inicialmente uma diminuição da carga microbiana e depois um desenvolvimento e crescimento dos bolores e leveduras até ao 8º dia. A partir deste dia verifica-se uma estabilização da contaminação. Quando os materiais foram incubados a 20°C, observou-se uma diminuição da carga microbiana nos primeiros dias do ensaio. A esta temperatura, verifica-se a estabilização da contaminação a partir do 10º dia. A análise da figura 4.22 mostra ainda que, em termos da contaminação dos materiais com bolores e leveduras, não se verificam diferenças significativas entre as temperaturas de incubação estudadas após o 8º dia ($P = 0,11$). No entanto, no início do ensaio verificou-se que à temperatura de 7°C, a contaminação é significativamente inferior à contaminação verificada a 20°C ($P = 3,3 \times 10^{-11}$). Ou seja, a 7°C, após a inoculação dos materiais, verificou-se que a cultura necessitou de um tempo de adaptação às novas condições experimentais, o que não ocorreu a 20°C.

A figura 4.23 apresenta a comparação da evolução da contaminação com bolores e leveduras, nas madeiras em estudo, com diferentes percentagens de humidade ensaiadas (7-10%H e 20-25%H).

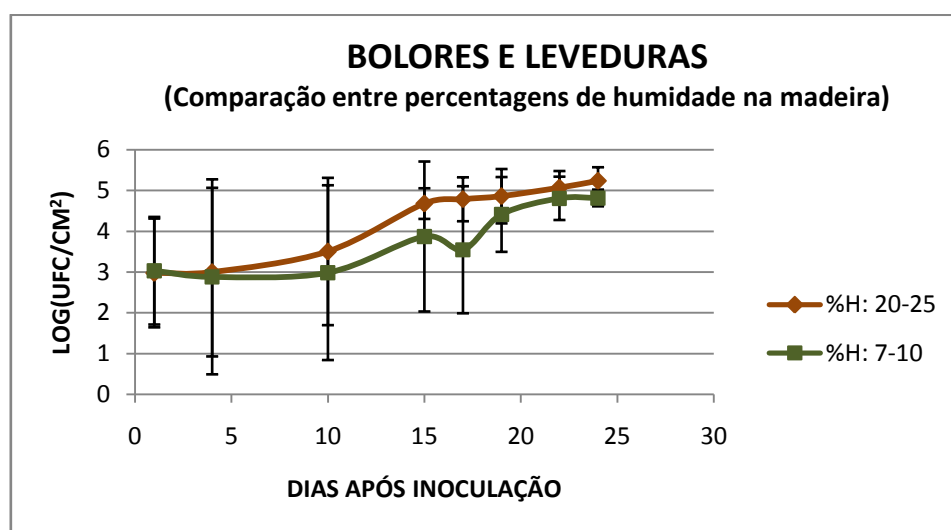


Figura 4.23: Comparação da evolução da contaminação com bolores e leveduras nas madeiras em estudo com diferentes percentagens de humidade.

A análise do gráfico anterior (figura 4.23) mostra que a percentagem de humidade na madeira não influencia a evolução da contaminação das madeiras com bolores e leveduras. Contudo, observa-se que as madeiras mais húmidas (20-25%H) se apresentam mais contaminadas do que as madeiras com apenas 7-10% de humidade. Esta diferença não é, no entanto, estatisticamente significativa ($P = 0,13$).

As figuras 4.24 e 4.25 apresentam a comparação da evolução da contaminação com bolores e leveduras, nas madeiras de diferentes proveniências e nos plásticos de diferentes tipos em estudo, respectivamente.

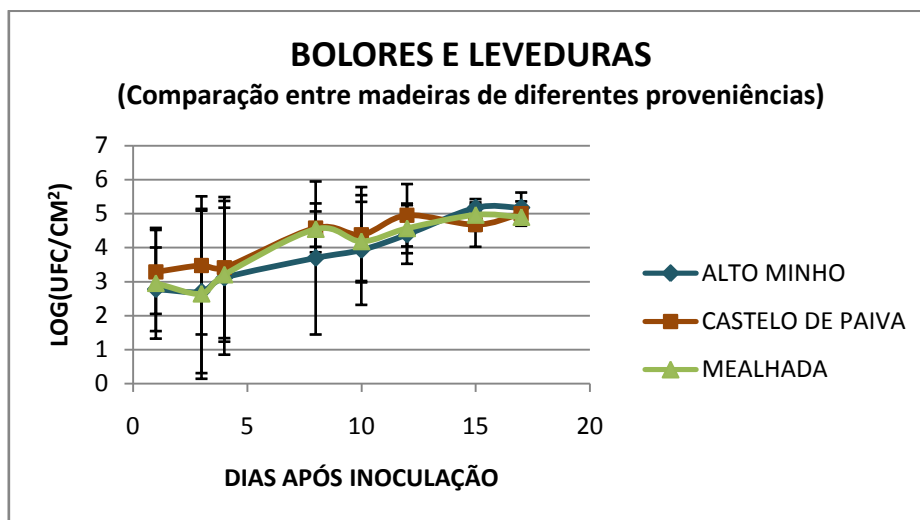


Figura 4.24: Comparação da evolução da contaminação com bolores e leveduras nas madeiras provenientes de três diferentes regiões de Portugal.

De acordo com os resultados apresentados na figura 4.24 pode-se concluir que não se observam diferenças significativas entre as diferentes madeiras de pinho, provenientes de diferentes regiões de Portugal (Alto Minho, Castelo de Paiva e Mealhada), em termos da evolução da contaminação com bolores e leveduras ($P = 0,64$).

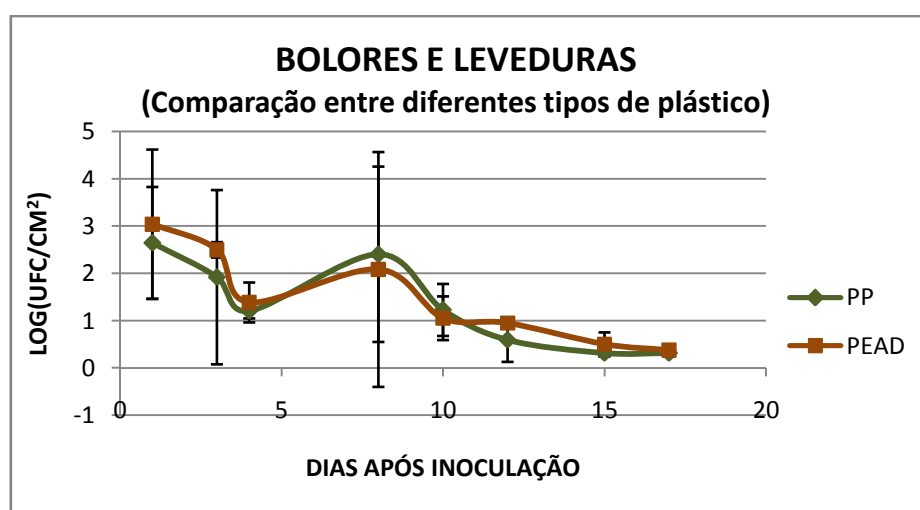


Figura 4.25: Comparação da evolução da contaminação com bolores e leveduras nos diferentes tipos de plástico (PP e PEAD).

Pela análise da figura 4.25, pode-se observar que não se obtiveram diferenças significativas nos dois tipos de plástico utilizados neste estudo (PP e PEAD), em termos da evolução da contaminação com bolores e leveduras ($P = 0,71$).

4.3.2 Contaminação com *Bacillus cereus*

Para o estudo com *Bacillus cereus*, os materiais a estudar foram inoculados com uma cultura pura de *Bacillus cereus* contendo $6,3 \times 10^7$ ufc/ml. Após a inoculação dos materiais, estudou-se a evolução da carga microbiana (*Bacillus cereus*) nestes, ao longo de cerca de 20 dias.

Os quadros 4.16 e 4.17 e as figuras 4.26 e 4.27 apresentam os resultados obtidos referentes à evolução da contaminação dos materiais com *Bacillus cereus* a 7°C e a 20°C, respectivamente, ao longo do tempo de ensaio (cerca de 20 dias).

Quadro 4.16: Evolução da Contaminação com *Bacillus cereus* nos materiais em estudo, ao longo do tempo, no ensaio efectuado a 7°C (log ufc/cm²)

		DIAS APÓS INOCULAÇÃO							
MATERIAIS		1	3	5	8	10	15	18	22
ALTO MINHO	7 – 10%H	4,16	3,73	3,47	3,29	3,28	2,82	2,89	2,57
	20 – 25%H	3,34	2,89	2,93	3,27	3,77	3,52	3,24	3,37
CASTELO DE PAIVA	7 – 10%H	4,32	2,57	3,11	3,48	3,92	3,18	2,85	3,01
	20 – 25%H	5,15	3,01	3,20	3,96	3,87	3,46	3,46	3,63
MEALHADA	7 – 10%H	3,90	3,10	3,05	3,62	3,30	3,79	3,18	3,29
	20 – 25%H	3,83	3,42	3,22	3,69	3,59	3,72	3,77	3,78
PP		4,04	2,57	3,16	2,73	3,49	2,78	2,64	2,45
PEAD		4,40	4,24	3,46	3,45	3,51	3,55	3,07	3,55

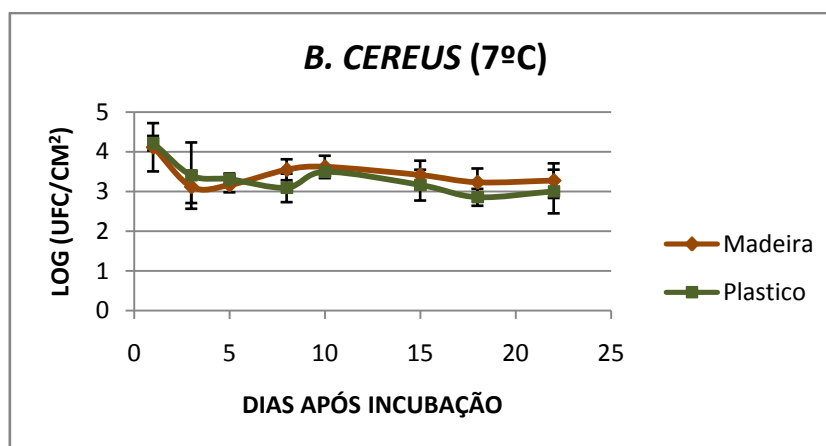


Figura 4.26: Evolução da contaminação com *Bacillus cereus* nos materiais em estudo a 7°C, ao longo do tempo.

Quando os materiais são incubados a 7°C, observa-se inicialmente uma diminuição da carga microbiana, mantendo-se esta constante a partir do 4º dia. Ao longo do período em estudo, cerca de 22 dias, não se verificam diferenças significativas em termos da contaminação com *Bacillus cereus* entre a madeira e o plástico, a esta temperatura ($P = 0,41$).

Quadro 4.17: Evolução da Contaminação com *Bacillus cereus* nos materiais em estudo, ao longo do tempo, no ensaio efectuado a 20°C (log ufc/cm²).

		DIAS APÓS INOCULAÇÃO							
MATERIAIS		1	6	8	10	13	15	20	22
ALTO MINHO	7 – 10%H	4,13	2,99	1,99	2,29	2,29	2,16	2,16	2,03
	20 – 25%H	4,04	3,07	2,44	2,30	2,74	2,98	3,60	2,64
CASTELO DE PAIVA	7 – 10%H	3,73	4,09	4,48	3,62	4,45	4,89	3,52	4,76
	20 – 25%H	3,69	3,73	3,36	3,36	3,33	3,40	2,88	3,77
MEALHADA	7 – 10%H	4,14	3,26	3,06	3,04	3,48	3,51	2,38	2,90
	20 – 25%H	4,20	3,14	3,55	3,25	3,99	3,36	3,33	3,04
PP		3,70	3,96	4,53	3,80	4,22	4,10	4,77	4,56
PEAD		3,94	4,60	4,30	3,67	4,90	5,18	4,00	5,66

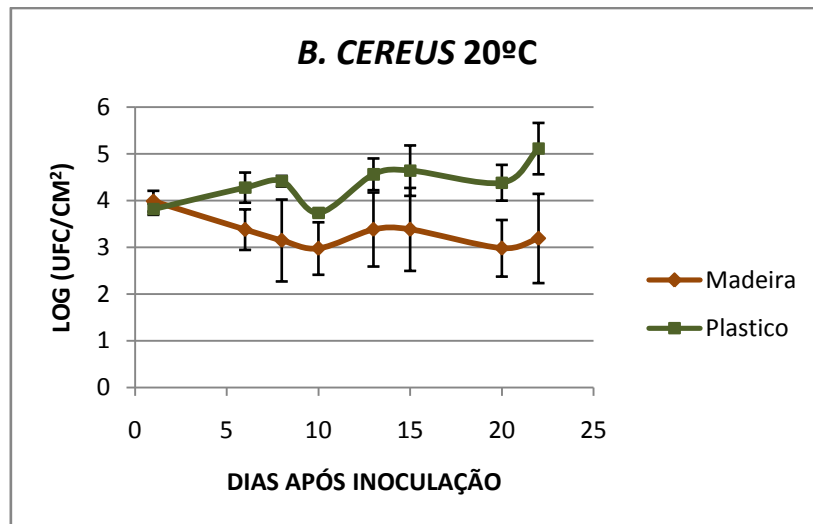


Figura 4.27: Evolução da contaminação com *Bacillus cereus* nos materiais em estudo a 20°C, ao longo do tempo.

Nos materiais incubados a 20°C observa-se um aumento da carga microbiana nos materiais de plástico, enquanto nos materiais de madeira se verifica uma ligeira diminuição da carga microbiana. Ao fim de 22 dias, a contaminação de *Bacillus cereus* nos plásticos era significativamente superior à das madeiras com este microrganismo ($P = 1,2 \times 10^{-6}$). Verificou-se também, a esta temperatura, que as madeiras contaminadas com *B. cereus*, apresentaram no final do ensaio, fungos e leveduras (Figura 4.28).

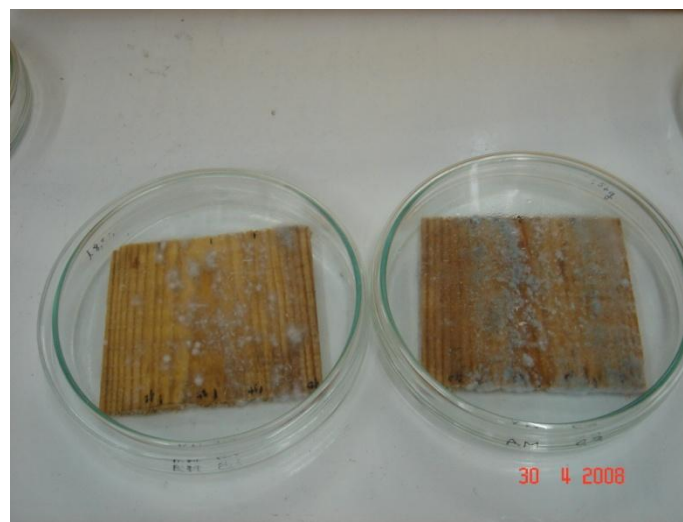


Figura 4.28: Crescimento de bolores e leveduras em madeiras inoculadas com *B. cereus*.

A figura 4.29 apresenta a comparação da evolução da contaminação com *B. cereus* às diferentes temperaturas ensaiadas (7 °C e 20°C).

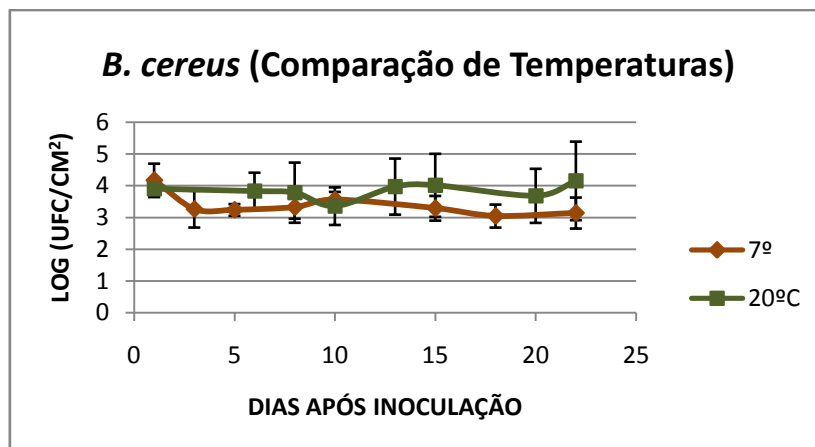


Figura 4.29: Comparação da evolução da contaminação com *Bacillus cereus* nos materiais em estudo (madeira e plástico) a diferentes temperaturas.

A análise do gráfico anterior (figura 4.29) mostra que, em termos da contaminação dos materiais com *Bacillus cereus*, não se verificam diferenças significativas entre temperaturas de incubação, embora a contaminação a 20°C seja superior à contaminação observada a 7°C (sem significado estatístico, $P = 0,18$). A contaminação manteve-se constante ao longo do ensaio.

A figura 4.30 apresenta a comparação da evolução da contaminação com *B. cereus*, nas madeiras em estudo, com diferentes percentagens de humidade ensaiadas (7-10% H e 20-25% H).

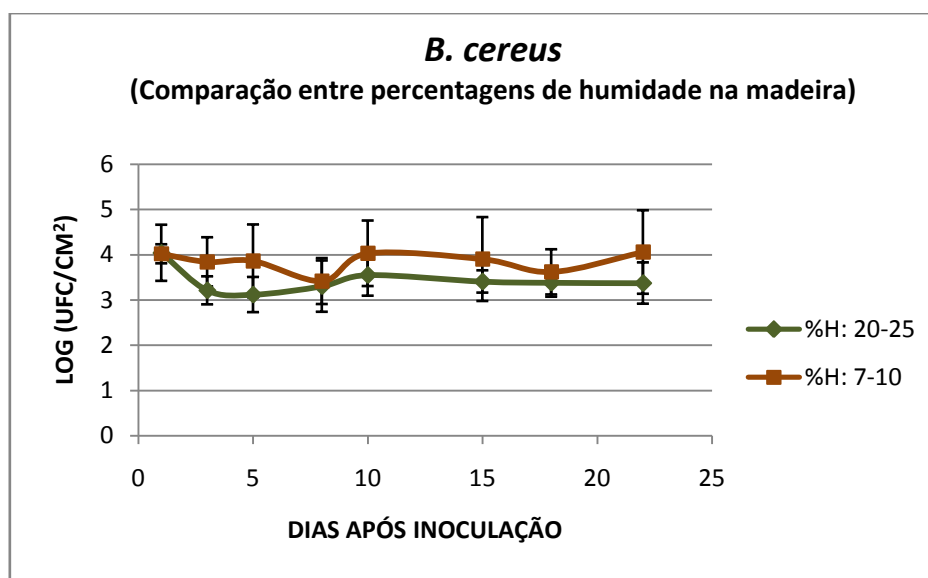


Figura 4.30: Comparação da evolução da contaminação com *Bacillus cereus* nas madeiras em estudo com diferentes percentagens de humidade.

A análise do gráfico que consta na figura 4.30 mostra que a percentagem de humidade na madeira não influencia a evolução da contaminação das madeiras com *Bacillus cereus*. Contudo, verifica-se que as madeiras com maior percentagem de humidade (20-25% H) se apresentam menos contaminadas do que as com apenas 7-10% de humidade. Esta diferença não é, no entanto, estatisticamente significativa ($P = 0,40$).

As figuras 4.31 e 4.32 apresentam a comparação da evolução da contaminação com *B. cereus*, nas madeiras de diferentes proveniências e nos plásticos de diferentes tipos em estudo, respectivamente.

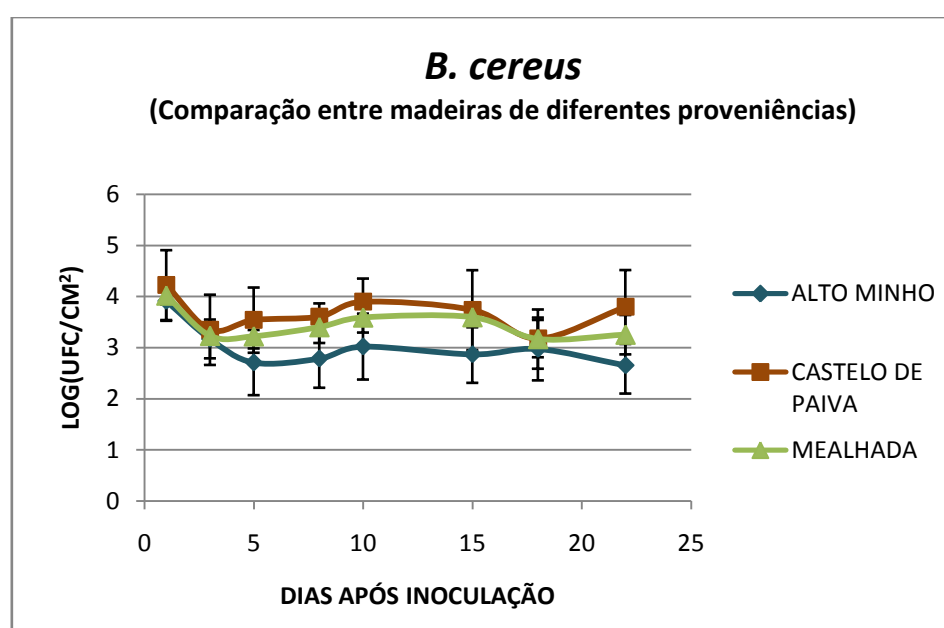


Figura 4.31: Comparação da evolução da contaminação com *Bacillus cereus* nas madeiras provenientes de três diferentes regiões de Portugal.

De acordo com os resultados apresentados na figura 4.31 pode-se concluir que se observam diferenças significativas entre as madeiras de pinho, de diferentes proveniências, em termos da evolução da contaminação com *B. cereus* ($P = 3,4 \times 10^{-5}$). As madeiras provenientes do Alto Minho apresentaram uma contaminação significativamente inferior às de Castelo de Paiva e da Mealhada. Não se observaram diferenças significativas entre estas últimas, em termos da contaminação com *B. cereus*. Dado que as madeiras sofrem o mesmo tipo de tratamento, exceptuando o caso da madeira proveniente de Castelo de Paiva, pelos motivos anteriormente expostos, a diferença comportamental associada à madeira de Alto Minho poderá dever-se à origem da própria madeira.

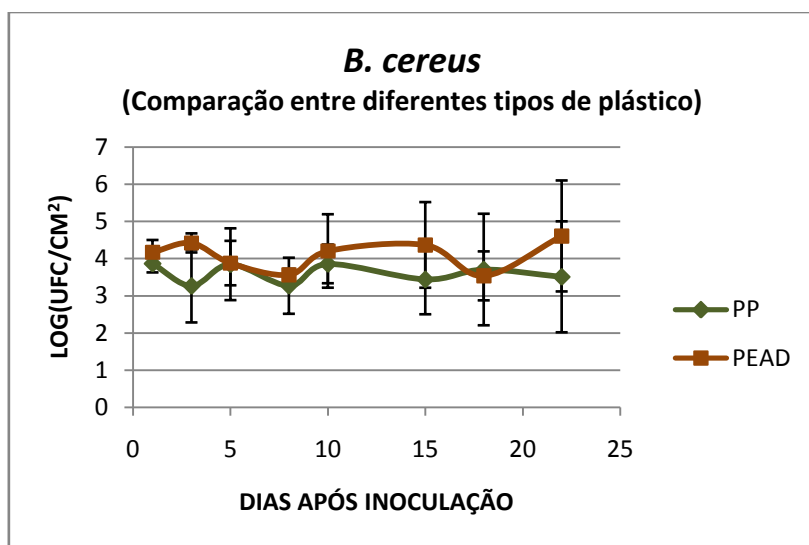


Figura 4.3: Comparação da evolução da contaminação com *Bacillus cereus* nos diferentes tipos de plástico (PP e PEAD).

Pela análise da figura 4.32, pode-se observar que não se obtiveram diferenças significativas nos dois tipos de plástico utilizados neste estudo (PP e PEAD), em termos da evolução da contaminação com *Bacillus cereus* ($P = 0,07$).

5. Conclusões

O principal objectivo deste estudo era comparar a higiene de caixas de madeira com caixas de plástico destinadas a ser utilizadas na embalagem de produtos hortofrutícolas.

Nas amostras recolhidas no MARL, verificou-se que não existiram diferenças significativas entre a contaminação microbiana das caixas de madeira e de plástico, para a maioria dos microrganismos pesquisados e enumerados. Contudo, na contagem de bolores e leveduras a 37°C, em caixas contendo produtos hortícolas, verificou-se uma maior contaminação em caixas de madeira do que em caixas de plástico. Esta diferença observada é, estatisticamente, altamente significativa. Verificaram-se, no entanto, diferenças significativas entre o tipo de alimento contido nessas caixas, fruto ou hortícola, em termos da contagem de alguns microrganismos (bolores e leveduras e coliformes), tendo-se observado uma maior contaminação nas caixas contendo produtos hortícolas.

Verificou-se ainda que as embalagens que apresentaram valores mais elevados de contaminação microbiológica (madeira ou plástico), eram também aquelas que apresentavam uma maior falta de higiene e de limpeza. Por outro lado, é de referir ainda que na maior parte das amostras analisadas, não foram detectados alguns dos microrganismos pesquisados, o que indica algum cuidado na higiene e limpeza das embalagens.

A análise dos resultados obtidos no Ensaio 2 mostrou também que os materiais de madeira apresentaram um comportamento semelhante ao dos materiais de plástico. Ou seja, nas diversas condições experimentais estudadas neste ensaio, não se verificou que a madeira possa ser mais susceptível à contaminação do ambiente circundante do que o plástico. Ainda de acordo com os resultados obtidos neste ensaio, verificou-se que os materiais sujeitos à contaminação em ambiente exterior, onde as amplitudes térmicas e de humidade foram superiores, apresentaram uma contaminação microbiana significativamente mais elevada do que a observada nos materiais que foram armazenados em refrigeração (4-7°C) e a uma temperatura (20°C) e humidade (55–60% H) controladas. Estes resultados vêm realçar a importância das condições de armazenamento, transporte e comercialização no controlo da higiene de embalagens alimentares.

De acordo com os resultados obtidos no Ensaio 3, verificou-se que os materiais de madeira possibilitam o crescimento e desenvolvimento de bolores e leveduras, não se verificando o mesmo nos materiais de plástico. Por outro lado, verificou-se que os materiais de plástico, à temperatura de 20°C, possibilitam um maior crescimento e desenvolvimento de *B. cereus* do que os materiais de madeira. Significa, portanto, que é essencial, quer em embalagens de madeira, quer em embalagens de plástico, garantir a

higiene e desinfecção das mesmas, antes da sua utilização. A não efectivação deste requisito poderá implicar, em embalagens de madeira, o crescimento e desenvolvimento de bolores e leveduras, e em embalagens de plástico, o crescimento e desenvolvimento de *B. cereus*, que podem contaminar os produtos acondicionados, constituindo por isso um risco para a saúde pública.

Os resultados obtidos neste estudo apontam para a possibilidade de contaminação e desenvolvimento microbiano nos materiais usados nas embalagens de produtos hortofrutícolas, sobretudo devido à ausência de boas práticas de higiene. É, portanto, fundamental que se realize a higienização, a limpeza e a desinfecção das caixas destinadas a acondicionar produtos hortofrutícolas para evitar a proliferação de microrganismos. No seguimento deste trabalho, seria interessante testar e estudar quais as melhores técnicas e desinfectantes a utilizar neste tipo de embalagens, de modo a assegurar uma correcta limpeza e desinfecção entre utilizações.

A localização e as condições de armazenamento contribuem também significativamente para o controlo da qualidade microbiológica das embalagens de produtos hortofrutícolas. Estes requisitos são válidos para os dois tipos de material estudados, ou seja, é necessário ter estes cuidados quer os materiais sejam de madeira, quer sejam de plástico.

6. Bibliografia

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I. (2008) Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments, *International Journal of Food Microbiology*, 123, pp. 121-129.
- Abrantes, A. I. C. (2007) *Implementação de análises microbiológicas da água para consumo humano*, Relatório de Estágio Curricular da Licenciatura Terminal em Tecnologia e Segurança Alimentar, FCT/UNL, 186 p.
- Adams, M. R., Moss, M. O. (1997) *Microbiologia de los alimentos*, Editorial Acribia, S.A. (Ed.), Saragoça, Espanha, 464 p.
- Almeida, D. (2005) *Manuseamento de Produtos Hortofrutícolas*. SPI (1ª Ed) Porto, Portugal, 112 p.
- American Society for Quality (ASQ Food, Drug and Cosmetic Division). (2002). *ASQ HACCP handbook – The certified quality auditor's HACCP handbook*. ASQ Quality Press. Milwaukee.
- Babesí, M.E., Díaz, R.V., Guevara, L. e Tapia, M.S. (2006). “Calidad Higiénica y Patógenos Asociados com Melones Mínimamente Procesados Expendidos en Supermercados”. In: *Livro de comunicações no I Simpósio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados*, San Pedro, SP Brazil, Abril 2006, pp 47 – 54.
- Bartz, J.A. (1999). “Washing fresh fruits and vegetables: lessons from treatment of tomatoes and potatoes with water”. *Dairy Food Environ Sanit* **19**(12), pp 853–864.
- Beuchat, L.R. (1998). *Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review*. World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2.
- Beyer, G., Guðbjörnsdóttir, B. (2002) Project Part Report no. 8: *Wood in the food industry – Guidelines for handling wooden pallets and packaging*. Nordic Industrial Fund – Nordic Wood 2.
- Camelo, A.F.L. (2004). *Manual for the preparation and sale of fruits and vegetables – From field to market*. FAO Agricultural Services Bulletin 151. Rome, Italy.
- Coles, R., McDowell, D., Kirwan, M.J. (2003). *Food Packaging Technology*. Blackwell Publishing, CRC Press, Oxford, 346 p.
- De Roever, C. (1999). “Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce”. *Food Control* **9**, pp 117–143.
- Decisão da Comissão nº 2001/471/CE de 8 de Junho. *Jornal das Comunidades* nºL165/48 de 21 de Junho de 2001.

Decreto-Lei 366-A/97 (1997) Princípios e Normas aplicáveis ao sistema de gestão de embalagens e resíduos de embalagens. Diário da República nº 293, I Série-A, 20 de Dezembro de 1997, pp.6732-(498-502).

Decreto-Lei 560/99 (1999) Rotulagem dos géneros alimentícios. Diário da República nº 293, I Série-A, 18 de Dezembro de 1999, pp.9049-9058.

Dutka, D. (1978) *Methods for microbiological analysis of water, wastewater and sediments*. Canada Center for Inland Waters. Burlington, Ontário, Canadá

EN ISO 6887 -1 (1999) *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1. General rules for the preparation of the initial suspension and decimal solutions*)

FAO. (1998). *Food Quality and Safety System: A training manual on food hygiene and the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system*. Publishing Management Group, FAO Information Division, Rome.

FDA. (1998). *Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables*. U.S. Food and Drug Administration.

FDA. (2001). *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook – The “Bad Bug Book.”* U.S. Food and Drug Administration- Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Fernando, A.L. (2006). *Folhas de Apoio à disciplina de Acondicionamento e Embalagem de Alimentos*, GDEH, FCT/UNL

Fernando, A.L.A.C. (1996) *Valorização da biomassa obtida em lagoas fotossintéticas de alta carga a partir de um efluente de suinicultura*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Alimentar, FCT/UNL, Caparica, Portugal, 147 p.

Frazier, W.C., Westhoff, D. C. (1991). *Microbiología de los Alimentos*. 3ª Ed. Editorial Acribia, S.A. Saragoça, Espanha, 439 p.

Gilbert R. (2000). *Evaluation of the microbiological safety of fruits and vegetables eaten raw, and products thereof*. European Commission Health & Consumer Protection Directorate- General.

Guðbjörnsdóttir, B., Arason, S. and Beyer, G. (2002) Report no. 9: *Hygienic properties of wood . Field Studies on wooden pallets and wood in constructions (gluelam)*. Nordic Industrial Fund – Nordic Wood 2.

Hui, Y.H. (1992). *Encyclopedia of Food Science and Technology*. Volume 3. John Wiley & Sons, Inc. USA

ISO 4831 (2006) *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms - Most probable number technique*

ISO 6222 (1999) *Water Quality – Enumeration of culturable micro-organisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.*

ISO 7899-1 (1998) *Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and waste water.*

ISO 8199 (2005) *Water quality – General guide to the enumeration of microorganism by culture.*

ISO 16649-2 (2001) *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide*

ISO/TC 11133-1 (2000) *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 1. General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory) microorganisms by culture),*

ISO/TC 11133-2 (2003) *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 2. Practical guidelines on performance testing of culture media),*

National Standard Method F15i1.4 (2005) *Enumeration of Bacillus cereus and other Bacillus species*, Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory, Specialist and Reference Microbiology Division, NHS, HPA & NPHSW, UK

NP 1828 (1982) *Microbiologia Alimentar. Colheita de amostras para análise microbiológica.*

NP 1829 (1982) *Microbiologia Alimentar. Preparação da amostra para análise microbiológica*

NP 2308 (1986) *Microbiologia alimentar. Regras gerais para pesquisa de Escherichia coli.*

NP 2079 (1989) *Microbiologia Alimentar. Regras gerais para análise microbiológica.*

NP 3277-1 (1987) *Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 25°C.*

NP 3277-1 (1987) *Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte 2: Incubação a 25°C.*

Pico, F. (2008). *Comunicação Pessoal.*

Poças, M.F.F. e Oliveira, F.A.R. (2001) *Manual de Embalagem para Hortofrutícolas Frescos*. Serviços de Edição da ESB/UCP (1ª Ed) Porto, Portugal, 29 p.

Regulamento (CE) Nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* L 139 de 30 de Abril de 2004, 1-54 pp.

Regulamento (CE) Nº 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Outubro de 2004 relativo aos materiais e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos e que revoga as Directivas 80/590/CEE e 89/109/CEE. *Jornal Oficial da União Europeia* L 338 de 13 de Novembro de 2004, 4-17 pp.

Regulamento (CE) Nº 2023/2006 da Comissão de 22 de Dezembro de 2006 relativo às boas práticas de fabrico de materiais e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos. *Jornal Oficial da União Europeia* L 384 de 29 de Dezembro de 2006, 75-78 pp.

Revol-Junelles, A., Miguindou-Mabiala, R., Roger-Maigné, D., Millière, J. (2005) “Behavior of *Escherichia coli* cells and *Bacillus cereus* spores on poplar wood crates by impedance measurements.” *Journal of Food Protection*, **68**, nº1, 80-84 pp.

Robertson, G.L. (2006) *Food Packaging. Principles and Practice*. 2nd edition, CRC Press. Boca Raton, 550 p.

Suslow, T. (1997). Microbial food safety: an emerging challenge for small-scale growers *Small Farm New*. pp 7–10.

Suslow, T. (1997). *Postharvest chlorination: Basic properties and key points for effective disinfection*. University of California. Publication 8003, 8 p.

[1] <http://www.horticom.com/pd/imagenes/56/468/56468.html>, acedido em Julho 2008

[2] www.magom.com.br, acedido em Setembro 2008

[3] http://www.envapack.com/envases_empaques309.html, acedido em Julho 2008