



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Helena Adriana Pinto Martins Pereira

Avaliação da termorresistência de microrganismos formadores de esporos em preparados FRULACT



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Helena Adriana Pinto Martins Pereira

**Avaliação da termorresistência de
microrganismos formadores de
esporos em preparados FRULACT**

Tese de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Lígia Raquel Marona Rodrigues
e da
Dr^a Cristina Martins Rodrigues

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje, mas continue
em frente de qualquer jeito.”

Martin Luther King

Agradecimentos

Nesta secção gostaria de deixar um sincero agradecimento a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o sucesso e realização deste trabalho. No entanto, gostaria de destacar algumas pessoas que me ajudaram nesta caminhada e tiveram especial impacto na realização deste projeto.

Ao centro de Inovação & Tecnologia da Frulact, nomeadamente à Eng.ª Cândida Miranda que me concedeu a oportunidade de desenvolver o meu estágio curricular num ambiente industrial e empresarial.

À minha orientadora na FRULACT, a Dr.ª Cristina Rodrigues por toda a ajuda, paciência, partilha de conhecimentos, simpatia, confiança demonstrada no meu trabalho e acompanhamento durante o desenvolvimento do projeto, assim como pela preocupação e encorajamento nos momentos mais complicados do projeto.

À minha orientadora na Universidade do Minho, a Professora Doutora Lígia Rodrigues pela orientação, partilha de conhecimentos, disponibilidade, pelo apoio prestado e pelo interesse demonstrado.

A todo o corpo técnico do centro de IDI do FRUTECH, sediado na unidade da Maia, por toda ajuda prestada e pela partilha de conhecimentos.

Aos meus amigos, pelo apoio, companheirismo e momentos de fraternidade partilhados.

À Ana Paula, à Margarida, ao José e à Sara, meus colegas de estágio e amigos, pela partilha da experiência, pela ajuda prestada em momentos mais críticos, pela escuta dos desabafos, pela entreatajuda, pelo companheirismo e pela paciência.

Ao Nuno, por todo o apoio incondicional, pelo carinho, pela compreensão, ajuda e paciência demonstradas nos momentos mais difíceis ao longo deste projeto e do todo o meu percurso académico.

Aos meus pais, à minha avó e à minha irmã pelo apoio, pela compreensão e por me darem as ferramentas para eu alcançar os meus objetivos.

Resumo

A segurança alimentar constitui uma das principais preocupações da população mundial, estando largamente relacionada com a saúde humana e o desenvolvimento económico. Neste sentido, o processamento térmico assume especial interesse, na medida em que é constituído por metodologias capazes de inativar a carga microbiana associada a produtos alimentares, garantindo a sua segurança junto do consumidor. Com base no conhecimento dos microrganismos, em particular dos termorresistentes, prevalentes não só nas matérias-primas utilizadas na formulação dos preparados FRULACT, como também presentes ao longo do processo produtivo, são selecionados aqueles que devem ser controlados durante o processamento térmico. Assim, o desafio passa pela avaliação do binómio tempo-temperatura de pasteurização que melhor se adequa às características dos preparados FRULACT, atendendo à avaliação da resistência microbiana, face à aplicação de diferentes temperaturas, condições de pH e atividade da água para uma determinada matriz, nunca descurando a manutenção das características organolépticas e nutricionais dos mesmos. Inicialmente, caracterizaram-se microbiologicamente as matérias-primas, nomeadamente bagas e cereais, seguindo-se a avaliação do impacto das diferentes etapas do processo produtivo na quantidade e diversidade microbiológica dos preparados, nomeadamente a etapa de ingredientação. Para isso, foram estudados três preparados considerados críticos, nomeadamente amora, framboesa e cereais. Numa última fase, determinaram-se os parâmetros de cinética de inativação térmica (D_T e z) para os microrganismos termorresistentes selecionados, nomeadamente a espécie – *Thermoactinomyces vulgaris* – identificada no preparado de framboesa – e a espécie *Bacillus smithii* – identificada no preparado de cereais. Os resultados obtidos para o *T. vulgaris* mostram valores de $D_{90\text{ }^\circ\text{C}} = 3,23 \pm 0,19$ min ($z = 10,99 \pm 0,17$ °C) e $D_{90\text{ }^\circ\text{C}} = 5,11 \pm 3,37$ min ($z = 57,80 \pm 36,12$ °C) para o preparado de framboesa com baixo °Brix, depois de exposto a dois binómios tempo-temperatura de ingredientação distintos; enquanto que para o preparado de framboesa de elevado °Brix este microrganismo apresenta valores de $D_{90\text{ }^\circ\text{C}} = 17,89 \pm 14,27$ min ($z = 7,82 \pm 3,08$ °C) e $D_{90\text{ }^\circ\text{C}} = 4,53 \pm 2,04$ min ($z = 51,85 \pm 20,96$ °C). Os resultados obtidos para *B. smithii* mostram valores de $D_{90\text{ }^\circ\text{C}} = 1,31 \pm 0,30$ min ($z = 32,20 \pm 11,04$ °C), para o preparado de cereais, quando exposto igualmente a um binómio tempo-temperatura de ingredientação pré-definido.

Palavras-chave: pasteurização; termorresistência; esporulação; *Bacillus*; preparados de fruta; bagas; cereais

Abstract

Food safety is one of the main concerns of the global population, being largely related to public health and economic development. Thus, the thermal processes are of particular interest since they enable the inactivation of the microbial load related to food products, ensuring its safety for the consumer. Based on the knowledge of the microorganisms, especially those which are thermoresistant, prevalent not only in the raw material but also along the production process, those who should be controlled during the thermal processing are selected. Therefore, the challenge is to evaluate the time-temperature binomial of pasteurization that best fits the FRULACT's preparations characteristics, having in mind the evaluation of the microbial resistance to different temperatures; pH conditions and water activity never neglecting the maintenance of the organoleptic and nutritional characteristics. Initially, the raw materials were characterized microbiologically, namely the cereals and berries, followed by the evaluation of the impact of the different production process stages on the amount and microbial diversity of the preparations, specifically during the mixture of ingredients' stage. For this purpose, three preparations considered critical were studied, namely blackberry, raspberry and cereals. At a late stage, the thermal inactivation kinetics parameters (D_T and z) were determined for the thermoresistant microorganisms selected, namely the species - *Thermoactinomyces vulgaris* – identified in the raspberry preparation – and the species *Bacillus smithii* – identified in the cereals preparation. The results obtained for the *T. vulgaris* show values of $D_{90^\circ\text{C}} = 3.23 \pm 0.19$ min ($z = 10.99 \pm 0.17$ °C) and $D_{90^\circ\text{C}} = 5.11 \pm 3.37$ min ($z = 57.80 \pm 36.12$ °C) for the raspberry preparation with low °Brix after being exposed to two different mixture of ingredients' time-temperature binomials, while for the raspberry preparation of high °Brix, this microorganism presents values of $D_{90^\circ\text{C}} = 17.89 \pm 14.27$ min ($z = 7.82 \pm 3,08$ °C) and $D_{90^\circ\text{C}} = 4.53 \pm 2.04$ min ($z = 51.85 \pm 20.96$ °C). The results acquired for *B. smithii* show values of $D_{90^\circ\text{C}} = 1.31 \pm 0.30$ min ($z = 32.20 \pm 11.04$ °C), after the cereals preparation being exposed to a mixture of ingredients' time-temperature binomial of 1 h 50 °C.

Keywords: pasteurization, thermoresistance, sporulation, *Bacillus*, fruit preparations, berries; cereals

Lista de siglas e abreviaturas

°C	Graus Celsius (escala de medida da temperatura)
°Brix	Grau Brix (escala de medida da quantidade de açúcar)
aw	Atividade da água
BPW	<i>Buffered Peptone Water</i>
CE	Comissão Europeia
D	Tempo necessário para ocorrer a redução de um ciclo logarítmico (minutos)
EN	European Union
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
ISO	<i>International Standard Organization</i>
log	logaritmo
MP	matéria-prima
MRB	<i>Maximum Recovery Broth</i>
p	Pressão de vapor da água do substrato do alimento
ρ	Probabilidade de significância
p_0	Pressão do vapor de água pura
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PDA	<i>Plate Dextrose Agar</i>
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
RBCA	<i>Rose Bengal Chloramphenicol Agar</i>
RCM	<i>Reinforced Clostridial Medium</i>
T _{min}	Temperatura mínima em °C
T _{máx}	Temperatura máxima em °C
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
% v/v	percentagem em volume
WHO/OMS	<i>World Health Organization</i> / Organização Mundial de Saúde
z	Aumento de temperatura necessário para reduzir um ciclo logarítmico (°C)

Índice

Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1. Motivação e enquadramento do projeto.....	1
1.2. Apresentação da empresa.....	2
1.3. Objetivos.....	3
1.4. Organização da dissertação.....	4
Capítulo 2 – Revisão da literatura.....	5
2.1. Conceito de Segurança Alimentar.....	5
2.2. Caracterização microbiológica de matrizes alimentares.....	6
2.2.1. Bactérias.....	6
2.2.1.1. Ciclo de vida das bactérias.....	7
2.2.1.2. Caracterização das bactérias.....	9
2.2.1.3. Bactérias associadas à deterioração dos alimentos.....	9
2.2.2. Fungos filamentosos.....	11
2.2.3. Leveduras.....	14
2.2.4. Vírus e Protozoários.....	15
2.3. Fatores que afetam a estabilidade microbiana.....	16
2.3.1. pH.....	17
2.3.2. A_w	17
2.3.3. Potencial oxidação-redução.....	19
2.3.4. Composição da matriz: conteúdo em nutrientes.....	19
2.3.5. Compostos antimicrobianos.....	20
2.3.6. Estruturas biológicas.....	20
2.3.7. Fatores extrínsecos.....	20
2.4. Processamento térmico.....	21
2.5. Processamento térmico: Fatores que afetam a termorresistência.....	23
2.5.1. A_w	23
2.5.2. Composição da matriz.....	23
2.5.3. pH.....	24
2.5.4. Curva de crescimento.....	24

2.6.	Processamento térmico: Parâmetros associados à pasteurização.....	25
2.6.1.	Valor de D_T	25
2.6.2.	Valor de z	26
2.6.3.	Fundamentos teóricos.....	27
2.7.	Importância da microbiologia preditiva.....	28
2.8.	Processamento alimentar: Uma Visão Industrial.....	29
2.8.1.	Processo produtivo: FRULACT.....	29
2.8.2.	Receção, transformação e armazenamento de matérias-primas.....	30
2.8.3.	Etapa de ingredientação, pasteurização e embalamento.....	30
2.9.	Preparados de fruta na Indústria Alimentar.....	31
2.9.1.	Composição genérica.....	32
2.9.2.	Matrizes de Fruta e Cereais.....	33
2.9.3.	Mercado Global.....	34
2.9.4.	Aplicação.....	35
2.9.4.1.	Produtos láteos dosificados com preparados de fruta.....	35
2.9.4.2.	Outras aplicações.....	36
Capítulo 3 – Materiais e Métodos.....		37
3.1.	Preparação de material.....	37
3.2.	Caracterização e monitorização da carga microbiana em matérias-primas consideradas críticas.....	37
3.3.	Recolha de amostras microbiológicas.....	38
3.4.	Análises microbiológicas.....	38
3.4.1.	Quantificação de mesófilos totais.....	39
3.4.2.	Quantificação de fungos filamentosos e leveduras.....	39
3.4.3.	Quantificação de bactérias formadoras de esporos.....	39
3.5.	Esquematização do processo.....	40
3.5.1.	Fase 1.....	40
3.5.2.	Fase 2.....	40
3.6.	Avaliação do impacto de diferentes binómios de tempo-temperatura de ingredientação.....	41

3.7.	Identificação e isolamento dos microrganismos-alvo capazes de resistir ao binómio tempo-temperatura aplicado na etapa de ingredientação.....	42
3.8.	Estudo do comportamento dos microrganismos-alvo identificados, durante a aplicação de diferentes binómios tempo-temperatura de pasteurização.....	42
3.8.1.	Inoculação dos preparados selecionados.....	42
3.8.2.	Determinação dos parâmetros de cinética de inativação térmica (D_T e z).....	43
3.9.	Procedimentos estatísticos.....	44
Capítulo 4 – Resultados e discussão.....		45
4.1.	Caracterização e monitorização da carga microbiana em matérias-primas consideradas críticas.....	45
4.1.1.	Avaliação da carga microbiana após se proceder à ordem de transformação das matérias-primas selecionadas.....	46
4.1.2.	Avaliação da variabilidade da carga microbiana associada a diferentes lotes de matérias-primas.....	47
4.1.2.1.	Framboesa.....	47
4.1.2.2.	Morango.....	49
4.1.2.3.	Farinha de trigo.....	50
4.1.2.4.	Farinha de aveia e farinha de cevada.....	51
4.2.	Avaliação do impacto de diferentes binómios tempo-temperatura de ingredientação, no comportamento da carga microbiana presente em matrizes FRULACT.....	52
4.2.1.	Preparado de amora.....	53
4.2.2.	Preparado de framboesa.....	56
4.2.3.	Preparado de cereais.....	59
4.3.	Seleção e identificação de microrganismos-alvo.....	62
4.4.	Validação dos ensaios de avaliação do impacto de diferentes binómios tempo-temperatura de ingredientação, no comportamento da carga microbiana presente em matrizes FRULACT.....	65
4.4.1.	Preparado de framboesa.....	65
4.4.2.	Preparado de cereais.....	67
4.5.	Determinação dos parâmetros de cinética de inativação térmica.....	69

4.5.1. Preparado de framboesa.....	70
4.5.1.1. Bactéria formadora de esporos mesófila aeróbia: <i>Bacillus</i> sp.....	70
4.5.1.2. Bactéria formadora de esporos termófila aeróbia: <i>Thermoactinomyces vulgaris/intermedius</i>	72
4.5.2. Preparado de cereais.....	75
4.5.2.1. Bactéria formadora de esporos mesófila aeróbia: <i>Bacillus</i> sp.....	75
4.5.2.2. Bactéria formadora de esporos termófila aeróbia: de <i>Bacillus</i> <i>smithii</i>	76
 Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras.....	 79
 Referências Bibliográficas.....	 83
 Anexos	
Anexo A – Caracterização microbiológica de matérias primas.....	97
Anexo B – Caracterização da etapa de ingredientação.....	107
Anexo C – Determinação dos parâmetros de cinética de inativação térmica.....	113

Índice de figuras

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de vida das bactérias e da esporulação bacteriana (Retirado de: <i>Farmácia Minha Vida</i> , 2013).....	7
Figura 2 – Estrutura do esporo bacteriano (Retirado de: Cavalcante, 2014).....	8
Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de vida dos fungos filamentosos (Adaptado de: <i>BlackMould</i>).....	12
Figura 4 – Representação esquemática do ciclo de vida das leveduras (Adaptado de: <i>Wikicommons</i>).....	14
Figura 5 – Curva de crescimento microbiano (Adaptado de: Tortora <i>et al.</i> , 2000).....	18
Figura 6 – Estrutura de <i>B. cereus</i> visualizada através de microscopia eletrônica de varrimento (Retirado de: Phung, 2013).....	22
Figura 7 – Lg de bactérias viáveis em função do tempo (min) (Adaptado de: University of Guelph, 2016).....	25
Figura 8 – Valor de D em função da temperatura (°C) (Adaptado de: University of Guelph, 2016).....	26
Figura 9 – Representação gráfica de uma curva de resistência térmica (Adaptado de: Fontana, 2009).....	27
Figura 10 – Esquemática das etapas desde a recepção da matéria-prima até à expedição do produto acabado.....	29
Figura 11 – Esquemática das análises microbiológicas para a quantificação de mesófilos totais, fungos filamentosos e leveduras.....	40
Figura 12 – Esquemática das análises microbiológicas para a quantificação de bactérias formadoras de esporos mesófilas e termófilas aeróbias e mesófilas e termófilas anaeróbias.....	41

Figura 13 – Carga microbiana associada à amora (□), amora escolhida A (■) e amora escolhida B (▒) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras ± desvio padrão com limite de detecção de $\lg(\text{UFC/g}) \geq 1$ 47

Figura 14 – Carga microbiana associada à framboesa A (□), framboesa B (■), framboesa C (▒), framboesa D (⊠) e framboesa E (⊡) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras ± desvio padrão com limite de detecção de $\lg(\text{UFC/g}) \geq 1$ 48

Figura 15 – Carga microbiana associada ao morango A (□), morango B (■) e morango C (▒) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras ± desvio padrão com limite de detecção de $\lg(\text{UFC/g}) \geq 1$ 49

Figura 16 – Carga microbiana associada à farinha de trigo sêmea fina (□), farinha de trigo sêmea grossa A (■), farinha de trigo sêmea grossa B (▒) e farinha de trigo sêmea grossa C (⊠) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras ± desvio padrão com limite de detecção de $\lg(\text{UFC/g}) \geq 1$ 50

Figura 17 – Carga microbiana associada à farinha de cevada A (□), farinha de cevada B (■), farinha de cevada C (▒), farinha de aveia A (⊠) e farinha de aveia B (⊡) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de

esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão com limite de detecção de $\lg(\text{UFC/g}) \geq 1$ 52

Figura 18 – Comparação do efeito do binómio de tempo-temperatura de ingredientação na carga microbiana do preparado de amora (baixo °Brix). Carga microbiana associada à matéria-prima (\square), ao binómio tempo-temperatura de ingredientação 2 h, 35 °C (\blacksquare), 3 h, 35 °C (\blacksquare), 3 h, 50 °C (\boxtimes), 4 h, 35 °C (\boxminus) e 4 h, 50 °C (\boxplus) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão..... 54

Figura 19 – Comparação do efeito do binómio de tempo-temperatura de ingredientação na carga microbiana do preparado de amora (elevado °Brix). Carga microbiana associada à matéria-prima (\square), ao binómio tempo-temperatura de ingredientação 2 h, 35 °C (\blacksquare), 3 h, 35 °C (\blacksquare), 3 h, 50 °C (\boxtimes), 4 h, 35 °C (\boxminus) e 4 h, 50 °C (\boxplus) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão..... 55

Figura 20 – Comparação do efeito do binómio de tempo-temperatura de ingredientação na carga microbiana do preparado de framboesa (baixo °Brix). Carga microbiana associada à matéria-prima (\square), ao binómio tempo-temperatura de ingredientação 2 h, 35 °C (\blacksquare), 3 h, 50 °C (\blacksquare), 3 h, 40 °C (\boxtimes) e 6 h, 40 °C (\boxminus) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão.....57

Figura 21 – Comparação do efeito do binómio de tempo-temperatura de ingredientação na carga microbiana do preparado de framboesa (elevado °Brix). Carga microbiana associada à matéria-prima (\square), ao binómio tempo-temperatura de ingredientação 2 h, 35 °C (\blacksquare), 1 h, 40 °C

(■), 3 h, 50 °C (⊞) e 1 h, 60 °C (⊞) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras ± desvio padrão..... 58

Figura 22 – Comparação do efeito do binómio de tempo-temperatura de ingredientação na carga microbiana do preparado de cereais. Carga microbiana associada à matéria-prima (□), ao binómio tempo-temperatura de ingredientação 1 h, 20 °C (■), 3 h, 20 °C (■), 2 h, 40 °C (⊞) e 3 h, 40 °C (⊞) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras ± desvio padrão com limite de deteção de lg (UFC/g) ≥ 1..... 60

Figura 23 – Compilação das culturas puras de (A) *Bacillus* sp., (B) *Bacillus* sp., (C) *Thermoactinomyces vulgaris/intermedius*, (D) *Bacillus smithii*, (E) *Bacillus* sp., (F) *Bacillus* sp., (G) *Bacillus* sp., (H) *Paenibacillus humicus* e (I) *Bacillus* sp..... 64

Figura 24 – Carga microbiana associada ao preparado de framboesa (baixo °Brix) para os binómios de tempo-temperatura de ingredientação de 2 h, 35 °C (■) e de 3 h, 50 °C (□) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras ± desvio padrão com limite de deteção de lg (UFC/g) ≥ 1.....67

Figura 25 – Carga microbiana associada ao preparado de framboesa (elevado °Brix) para os binómios de tempo-temperatura de ingredientação de 2 h, 35 °C (■) e de 3 h, 50 °C (□) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras ± desvio padrão..... 66

Figura 26 – Carga microbiana associada ao preparado de cereais para os binómios de tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 40 °C (□) e de 1 h, 50 °C (■) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão com limite de deteção de $\lg(\text{UFC/g}) \geq 1$ 67

Índice de tabelas

Tabela 1 – Classificação das bactérias de acordo com o intervalo de temperaturas que favorece o seu crescimento.....	9
Tabela 2 – Bactérias potencialmente presentes em frutos vermelhos, cereais e produtos complementares.....	11
Tabela 3 – Fungos filamentosos potencialmente presentes em frutos vermelhos, cereais e produtos complementares.....	13
Tabela 4 – Leveduras potencialmente presentes em frutos vermelhos, cereais e produtos complementares.....	15
Tabela 5 – Valores de pH ótimo e os limites máximo e mínimo necessários para o desenvolvimento microbiano.....	17
Tabela 6 – Intervalo de a_w dos alimentos que favorece o desenvolvimento microbiano (Mossel <i>et al.</i> , 1995; Adams e Moss, 2000; Jay <i>et al.</i> , 2005).....	18
Tabela 7 – Classificação dos microrganismos de acordo com o seu potencial de oxidação-redução.....	19
Tabela 8 – Valores de D e z para esporos de <i>Bacillus</i> e de alguns fungos filamentosos (Adaptado de: Batt e Tortorello, 2014; Jay <i>et al.</i> , 2005; Nakayama <i>et al.</i> , 1996).....	26
Tabela 9 – Aditivos alimentares utilizados em preparados de fruta.....	32
Tabela 10 – Composição nutricional de frutos vermelhos e cereais.....	33
Tabela 11 – Compilação dos parâmetros de °Brix (valor médio de 3 amostras $\pm 0,1$), pH (valor médio de 3 amostras $\pm 0,01$) e temperaturas mínima e máxima dos preparados de amora para diferentes binómios de tempo-temperatura de ingredientação.....	56
Tabela 12 – Compilação dos parâmetros de °Brix (valor médio de 3 amostras $\pm 0,1$), pH (valor médio de 3 amostras $\pm 0,01$) e temperaturas mínima e máxima dos preparados de framboesa para diferentes binómios de tempo-temperatura de ingredientação.....	59

Tabela 13 – Compilação dos parâmetros de °Brix (valor médio de 3 amostras \pm 0,1), pH (valor médio de 3 amostras \pm 0,01) e temperaturas mínima e máxima do preparado de cereais para diferentes binómios de tempo-temperatura de ingredientação.....	61
Tabela 14 – Compilação dos parâmetros físico-químicos – °Brix (valor médio de 3 amostras \pm 0,1), pH (valor médio de 3 amostras \pm 0,01) e a_w (valor médio de 2 amostras \pm 0,001) – do preparado de framboesa (baixo e elevado °Brix) (parâmetros registados a 22 °C).....	67
Tabela 15 – Compilação dos parâmetros físico-químicos – °Brix (valor médio de 3 amostras \pm 0,1), pH (valor médio de 3 amostras \pm 0,01) e a_w (valor médio de 2 amostras \pm 0,001) do preparado de cereais (parâmetros registados a 22 °C).....	69
Tabela 16 – Valores de °Brix (valor médio de 3 amostras \pm 0,1) e a_w (valor médio de 2 amostras \pm 0,001) ao longo do processo associados ao preparado de framboesa e de cereais.....	70
Tabela 17 – Compilação dos valores de D e z para <i>Bacillus sp.</i> presente no preparado de framboesa de baixo e elevado °Brix. Os resultados correspondem ao valor médio de 2 ensaios \pm desvio padrão.....	71
Tabela 18 – Compilação da simulação do binómio de tempo-temperatura de pasteurização a aplicar para <i>Bacillus sp.</i> no preparado de framboesa.....	72
Tabela 19 – Compilação dos valores de D e z para <i>T. vulgaris/ intermedius</i> presente no preparado de framboesa de baixo e elevado °Brix. Os resultados correspondem ao valor médio de 2 ensaios \pm desvio padrão.....	73
Tabela 20 – Compilação da simulação do binómio de tempo-temperatura de pasteurização a aplicar para <i>T. vulgaris</i> no preparado de framboesa.....	74
Tabela 21 – Compilação dos valores de D e z para <i>Bacillus sp.</i> inoculado no preparado de cereais. Os resultados correspondem ao valor médio de 2 ensaios \pm desvio padrão.....	78

Tabela 22 – Compilação da simulação do binómio tempo-temperatura de pasteurização a aplicar para <i>Bacillus</i> sp. no preparado de cereais.....	76
Tabela 23 – Compilação dos valores de D e z para <i>B. smithii</i> inoculado no preparado de cereais resultantes de dois ensaios laboratoriais, assim como o desvio padrão e a média do valor de z.....	77
Tabela A1 – Compilação da média das leituras para cada tipo de microrganismo e amostra de matéria prima em UFC/g.....	97
Tabela A2 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “Anova: fator único” entre grupos e do valor de p do “teste T: duas amostras com variâncias iguais” aplicado às amostras de amora escolhida, amora A e amora B.....	101
Tabela A3 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “Anova: fator único” entre grupos e do valor de p do “teste T: duas amostras com variâncias iguais” aplicado às amostras de framboesa A, framboesa B, framboesa C, framboesa D e framboesa E.....	102
Tabela A4 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “Anova: fator único” entre grupos e do valor de p do “teste T: duas amostras com variâncias iguais” aplicado às amostras de morango A, morango B e morango C.....	104
Tabela A5 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “Anova: fator único” entre grupos e do valor de p do “teste T: duas amostras com variâncias iguais” aplicado às amostras de farinha de trigo A, farinha de trigo B e farinha de trigo C.....	105
Tabela A6 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “Anova: fator único” entre grupos de farinha de cevada e entre grupos de farinha de aveia e do valor de p do “teste T: duas amostras com variâncias iguais” aplicado às amostras de farinha de cevada A, farinha de cevada B e farinha de trigo C.....	106
Tabela B1 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “Anova: fator único” entre a matéria prima e os binómios tempo-temperatura de ingredientação aplicados e entre binómios	

tempo-temperatura de ingredientação para o preparado de framboesa de baixo °Brix e elevado °Brix.....107

Tabela B2 – Resultados da média das 4 leituras efetuadas para o preparado de amora de baixo °Brix em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio tempo-temperatura de ingredientação aplicado..... 108

Tabela B3 – Resultados da média das 4 leituras efetuadas para o preparado de amora de elevado °Brix em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio tempo-temperatura de ingredientação aplicado..... 108

Tabela B4 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “*Anova*: fator único” entre a matéria prima e os binómios tempo-temperatura de ingredientação aplicados e entre binómios tempo-temperatura de ingredientação para o preparado de framboesa de baixo °Brix e elevado °Brix.....109

Tabela B5 – Resultados da média das 4 leituras efetuadas para o preparado de framboesa de baixo °Brix em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio tempo-temperatura de ingredientação aplicado..... 110

Tabela B6 – Resultados da média das 4 leituras efetuadas para o preparado de framboesa de elevado °Brix em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio tempo-temperatura de ingredientação aplicado..... 111

Tabela B7 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “*Anova*: fator único” entre a matéria prima e os binómios tempo-temperatura de ingredientação aplicados e entre binómios tempo-temperatura de ingredientação para o preparado de cereais..... 111

Tabela B8 – Resultados da média das 4 leituras efetuadas para o preparado de cereais em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio tempo-temperatura de ingredientação aplicado..... 112

Tabela C1 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus sp.* no preparado de framboesa de baixo °Brix, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais..... 114

Tabela C2 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus sp.* no preparado de framboesa de baixo °Brix, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais.....115

Tabela C3 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus sp.* no preparado de framboesa de elevado °Brix, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais.....115

Tabela C4 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus sp.* no preparado de framboesa de elevado °Brix, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais.....116

Tabela C5 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *T. vulgaris/intermedius* no preparado de framboesa de baixo °Brix, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais..... 117

Tabela C6 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *T. vulgaris/intermedius* no preparado de framboesa de baixo °Brix, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais.....119

Tabela C7 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *T. vulgaris/intermedius* no preparado de framboesa de elevado °Brix, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais..... 119

Tabela C8 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *T. vulgaris/intermedius* no preparado de framboesa de elevado °Brix, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais..... 121

Tabela C9 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus sp.* no preparado de framboesa de cereais, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais..... 121

Tabela C10 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus sp.* no preparado de cereais, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais..... 122

Tabela C11 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *B. smithii* no preparado de framboesa de cereais, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais..... 123

Tabela C12 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *B. smithii* no preparado de cereais, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais..... 123

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Motivação e enquadramento do projeto

Devido à crescente preocupação com a segurança alimentar, as empresas têm procurado, cada vez mais, metodologias que permitam garantir a segurança alimentar dos produtos que comercializam, bem como a satisfação das necessidades do consumidor. Como consequência da constante evolução do setor alimentar, a adaptação da legislação à realidade, levou a Comissão Europeia a rever as Diretivas Comunitárias e a publicar regulamentos que visam garantir a implementação de um processo produtivo seguro. De entre os regulamentos atualmente em vigor, destacam-se:

- Regulamento (CE) nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002: Determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios;
- Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios;
- Regulamento (CE) nº 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) no. 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios;

Neste contexto, os tratamentos térmicos, tais como a pasteurização e a esterilização, assumem especial importância na medida em que permitem a inativação da carga microbiana presente no produto acabado. No entanto, existem microrganismos, cuja elevada resistência a condições térmicas e físico-químicas extremas – sejam elas pH ácido e atividade de água (a_w) baixa – constituem um risco para a segurança alimentar do produto acabado, visto que podem, por um lado, ser considerados patogénicos e, por outro, ser resistentes à temperatura aplicada no decorrer do tratamento térmico.

Neste âmbito, um dos principais desafios deste trabalho visa entender o comportamento das bactérias e fungos filamentosos formadores de esporos ao longo do processo produtivo dos preparados FRULACT. Assim, a monitorização da carga microbiana em etapas como: (1) a receção, a transformação e o armazenamento de matérias-primas; (2) a ingredientação, destinada à formulação de cada preparado, obedecendo ao binómio de tempo-temperatura definido; (3) o cumprimento dos parâmetros associados ao tratamento térmico, a que o produto é submetido,

em cada linha de produção; e (4) o correto embalamento dos produtos acabados, devem ser criteriosamente avaliados de forma a controlar eventuais perigos que possam comprometer a segurança dos produtos e, conseqüentemente, a saúde dos consumidores.

Desta forma, o estudo das diferentes etapas do processo produtivo que influenciam a sobrevivência de microrganismos termorresistentes, bem como a determinação de um binómio de tempo-temperatura de pasteurização capaz de os inativar no produto acabado é crucial para que este seja seguro para o consumidor final e possua um maior tempo de vida útil.

1.2. Apresentação da empresa

O presente projeto de dissertação foi desenvolvido na FRULACT – Ingredientes para a Indústria Alimentar, S.A..

A empresa foi fundada em 1987 e resultou dos anos de experiência dos seus mentores, nomeadamente do Comendador Arménio Pinheiro Miranda, na indústria dos produtos lácteos. A empresa surgiu com a finalidade de produção de preparados de fruta para a indústria alimentar com vista à sua aplicação em laticínios, gelados, pastelaria e bebidas.

A empresa expandiu o seu negócio com a aquisição de uma nova unidade fabril no Ferro e em Tortosendo no ano de 1998 e 2006, respetivamente. Em 1999, a FRULACT apostou na sua internacionalização chegando a Marrocos. O seu processo de expansão continuou nos anos seguintes, na Tunísia, em 2000, servindo como plataforma de aprovisionamento dos mercados do Norte de África e Médio Oriente e mais tarde, em 2006, com a aquisição de uma empresa francesa, a *Granger Bouguet Pau*. Esta última reforçou a estratégia de proximidade com os clientes, no segundo maior mercado europeu do seu *core-business*. Em 2009, a FRULACT intensificou a sua presença no mercado francês com a divisão GR6, pertencente ao grupo *Kerry*, uma unidade fabril localizada no sudeste de França. Esta aquisição visou, para além da proximidade com o cliente, a sua posição como uma das principais empresas a atuar no mercado europeu do setor. Durante o ano de 2012, a FRULACT iniciou as operações de duas novas unidades fabris uma localizada em Marrocos e outra em Pretória, África do Sul, sendo que de momento encontra-se em fase de abertura uma nova unidade no Canadá. As unidades industriais acima mencionadas são responsáveis pela produção anual de 60 mil toneladas de preparados de fruta, originando um volume de negócios de 105 milhões de euros.

A unidade fabril da FRULACT na Maia, onde decorreu o presente projeto de dissertação, é uma unidade de processamento de fruta que produz preparados para as principais multinacionais da indústria alimentar, visto ser uma empresa *business to business*. É uma empresa tida como um exemplo de sucesso e reconhecimento na área dos preparados à base de fruta, tendo como objetivo desenvolver preparados inovadores a partir de produtos biológicos – nomeadamente frutas, cereais e vegetais – colocando assim à disposição do consumidor final produtos naturais, saudáveis e de elevada qualidade. Estes produtos traduzem-se em preparados de frutas, sumos, compotas, gelados, lacticínios, doces e *baby food*.

É de salientar, a elevada segurança na qualidade dos produtos FRULACT, ao nível do Sistema de Segurança Alimentar, segundo a norma DS3027E:2002. No entanto, a FRULACT encontra-se sempre empenhada na melhoria contínua da eficácia do seu Sistema de Gestão de Qualidade, certificado segundo a norma internacional NP EN ISO9001:2000.

Entre os seus clientes, a FRULACT possui nomes bastante conhecidos do sector alimentar tais como a Nestlé, a Danone, a Unilever, a Clesa, a Lactalis, a Lactogal, a Leche Pascual em Espanha e grandes hipermercados portugueses.

Em suma, a FRULACT é uma empresa jovem e dinâmica que aposta num carácter inovador e empreendedor, nas parcerias, na preocupação com o meio ambiente, nos mercados alvo e no potencial do capital humano. O reflexo do seu sucesso traduz-se nos diversos prémios recebidos, tais como o prémio Excelência Pequenas e Médias Empresas 1998, 1999, 2000, 2001; o prémio Inovação Agro-Indústria 2003; o Óscar da Exportação 2005 da Câmara de Comércio e Indústria Luso-Francesa; o prémio Inovação e Empreendedorismo 2006 (Menção Honrosa); prémio da Inovação e Tecnologia 2008; Negócio do Ano na Europa 2011; Campeão Nacional 2012; Estratégia de Crescimento Internacional do Ano 2013 pela *European Business Awards*; Líder do Ano em Novas Tecnologias pela Ano em Novas Tecnologias pela *Best Leader Awards* e em 2013 considerada a melhor Empresa do Ano pelo Jornal de Negócios e PwC.

1.3. Objetivos

Este projeto de dissertação teve como principais objetivos:

- Caracterização e monitorização da carga microbiana em matérias-primas consideradas críticas, nomeadamente frutas – framboesa, amora e morango – e cereais – aveia, trigo e cevada;

- Avaliação do impacto de diferentes binómios tempo-temperatura na etapa de ingredientação – aplicados de acordo com dados verificados em fábrica – no comportamento da carga microbiana presente na matriz, em especial, no quantidade e diversidade de microrganismos formadores de esporos;
- Identificação dos microrganismos-alvo capazes de resistir ao binómio de tempo-temperatura aplicado na etapa de ingredientação;
- Estudo do comportamento dos microrganismos-alvo identificados durante a aplicação de diferentes binómios de tempo-temperatura de pasteurização;
- Determinação dos parâmetros de cinética de inativação térmica (D_T e z) para os microrganismos identificados nas etapas antecedentes;
- Seleção do binómio de tempo-temperatura de pasteurização adequado à inativação dos microrganismos identificados no presente projeto.

1.4. Organização da dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos.

O capítulo 1 é composto pela introdução, incluindo o enquadramento do projeto, as motivações para o desenvolvimento do tema, a apresentação da empresa onde foi desenvolvido o projeto e os objetivos da dissertação.

O capítulo 2 consiste na revisão da literatura, resume um conjunto de conceitos gerais necessários para a correta interpretação do tema, assim como referências a investigações e a dados obtidos anteriormente, que constituem uma base científica para o projeto desenvolvido.

O capítulo 3 refere-se à metodologia onde é mencionado o procedimento experimental adotado, ao longo do projeto, assim como os materiais utilizados.

O capítulo 4 refere-se aos resultados e discussão, cujo conteúdo reúne a apresentação e discussão dos dados obtidos no desenvolvimento do presente projeto.

No capítulo 5 são apresentadas as conclusões obtidas com o presente trabalho e, em simultâneo aborda o balanço final em relação aos objetivos alcançados, limitações e recomendações. Finalmente, no último capítulo encontram-se listadas as referências bibliográficas, assim como os anexos que complementam a presente dissertação de mestrado.

Capítulo 2 – Revisão da literatura

2.1. Conceito de Segurança Alimentar

Atualmente, a principal causa de doença e morte nos países em desenvolvimento tem origem alimentar, conduzindo à morte de cerca de 1,8 milhões de pessoas anualmente (Veiga *et al.*, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença de origem alimentar é definida como uma doença de natureza infecciosa ou tóxica, causada pelo consumo de alimentos ou água, sendo reconhecida como a maior causa internacional de mortalidade e prejuízo económico (Viegas, 2009).

As estimativas mostram que as doenças de origem alimentar são mais frequentes do que indicam os dados oficiais, sendo que por ano afetam uma em cada três pessoas. Apesar de desde 2005 ser obrigatório para todos os Estados Membros da União Europeia a emissão de uma declaração de surtos de origem alimentar, em Portugal os dados relativos às doenças de origem alimentar são escassos – o que demonstra uma subavaliação da importância desta situação.

No entanto, apesar deste cenário público, o conceito de segurança alimentar constitui uma das principais preocupações para as empresas alimentares. Como tal, estas procuram de forma mais recorrente metodologias que permitam garantir a satisfação das necessidades do consumidor, assim como a segurança alimentar dos produtos que comercializam. Nesse sentido, surge o processamento alimentar capaz de prolongar o tempo de vida dos alimentos, aliado à manutenção da qualidade dos produtos alimentares comercializados.

A deterioração dos alimentos ocorre naturalmente pela ação dos microrganismos que os utilizam como fonte de nutrientes. Apesar desta ação conduzir à degradação dos alimentos, nem sempre é perceptível por parte do consumidor o que, conseqüentemente, resulta em doenças que, em última instância, podem conduzir à morte – caso estejamos a lidar com microrganismos patogénicos.

A evolução do conceito de segurança alimentar é um processo contínuo a nível internacional que acompanha as necessidades de diferentes povos e épocas (Burity *et al.*, 2010). No entanto, este conceito centra-se nos riscos que um alimento representa para a saúde do consumidor e, como tal, é definido como “garantia que um alimento não causará dano ao consumidor – através de perigos biológicos, químicos ou físicos – quando é preparado e/ou consumido de acordo com o uso esperado” (Araújo, 2007). Segundo a Comissão do *Codex Alimentarius* (2003), o perigo é definido como qualquer propriedade biológica, física ou química que possa tornar um alimento

prejudicial ao consumo humano. Sendo assim, a vida útil de um alimento pode ser influenciada por diversos fatores que condicionam a sua qualidade e sanidade como por exemplo: (1) a multiplicação e atividade de microrganismos; (2) a ação enzimática do alimento; (3) reações químicas não enzimáticas; (4) alterações provocadas por pragas; e (5) mudanças físicas causadas por ação mecânica (Gava *et al.*, 2008). Segundo Gava *et al.* (2008), de entre os fatores mencionados, as alterações de origem biológicas são as que, para além de influenciarem as características organoléticas, causam maior impacto na saúde do consumidor.

2.2. Caracterização microbiológica de matrizes alimentares

Dos parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, aqueles que definem as suas características microbiológicas são considerados os mais relevantes. Através da análise da qualidade microbiológica de um produto pode proceder-se à avaliação das condições necessárias para (1) o seu processamento; (2) armazenamento; (3) distribuição; (4) avaliação do tempo de validade; e (5) o risco que este representa para a saúde da população (Pariz, 2011).

A presença de determinados microrganismos representa um perigo biológico, sejam eles fungos, bactérias, vírus, parasitas ou toxinas microbianas. No entanto, também são estes microrganismos que assumem um papel importante na produção e transformação de determinados alimentos, sendo classificados como contaminantes ou benéficos (Gava *et al.*, 2008).

Na categoria dos contaminantes, os microrganismos podem dividir-se em: (1) deteriorantes – microrganismos que alteram as características organoléticas do produto; (2) patogénicos – microrganismos capazes de provocarem doenças no ser humano; (3) e indicadores de higiene, que permitem avaliar se as condições de higiene foram cumpridas durante o processamento de um determinado alimento.

Os microrganismos são classificados como benéficos quando a sua função visa contribuir para a estabilização de um determinado alimento, e.g. quando as leveduras são utilizadas para os processos de produção de pão e de cerveja.

2.2.1. Bactérias

Relativamente às bactérias, estas são o principal agente microbiológico responsável pelas doenças de origem alimentar. Os fatores que contribuem para a frequência destes microrganismos

nos alimentos estão sobretudo relacionados, por um lado, com a sua presença endógena e, por outro lado, com contaminações cruzadas fruto da manipulação dos mesmos. Frequentemente, a estes fatores acresce tempos e temperaturas de armazenamento inadequados o que, conseqüentemente, contribui para o desenvolvimento desta tipologia de microrganismos nos alimentos. A ingestão de bactérias, ou das toxinas que estas produzem, resulta em toxinfecções de origem alimentar (Baptista e Venâncio, 2003).

2.2.1.1. Ciclo de vida das bactérias

O ciclo de vida das bactérias encontra-se representado na figura 1 e inclui diversas fases, nomeadamente: (1) divisão celular; (2) formação do filamento axial e do septo; (3) envolvimento do pré-endósporo; (4) formação do córtex; (5) síntese da capa; (6) lise da célula vegetativa; e (7) libertação do endósporo.

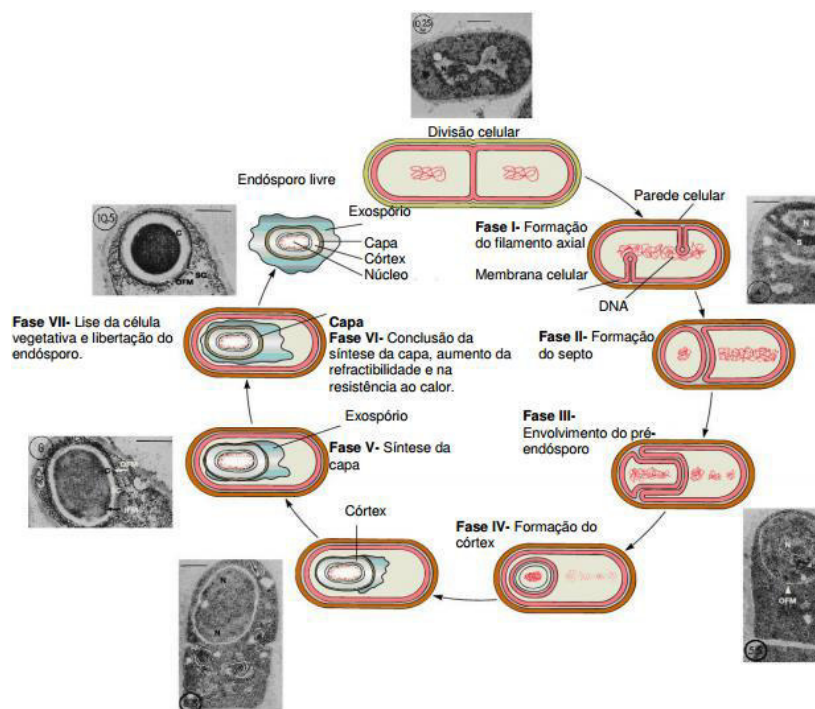


Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de vida das bactérias e da esporulação bacteriana (Retirado de: *Farmácia Minha Vida*, 2013).

Para o estudo da termorresistência dos microrganismos, a esporulação bacteriana representa uma etapa crucial visto que tem um grande impacto na sua sobrevivência. As bactérias formadoras de esporos podem ser agrupadas em mesófilas e termófilas, consoante a sua temperatura ótima de crescimento, e podem ser classificadas como aeróbias ou anaeróbias, de acordo com a fonte de energia que utilizam para o seu crescimento, i.e. através do oxigénio e/ou através de processos

de fermentação e respiração anaeróbia, respetivamente (Doyle *et al.*, 1997; Jay *et al.*, 2005). Esta tipologia de bactérias pertence, na sua maioria, à classe *Bacilli*, que inclui a ordem *Bacillales*, constituída pelas famílias *Bacillaceae*, *Alycibacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pasteuriaceae*, *Planococcaceae*, *Sporolactobacillaceae* e *Thermoactinomycetaceae* (Niall e Halket, 2011).

O esporo bacteriano é formado durante a fase estacionária como resposta a várias características ambientais e, principalmente, como resposta a dois fatores-chave: a privação de nutrientes e a densidade populacional (Driks, 1999; Miller e Bassler, 2001; McKenney *et al.*, 2013). A morfologia de esporo (figura 2) é tipicamente esférica, elipsoidal ou oval, sendo que a sua localização dentro do exósporo pode variar entre a posição central, paracentral, subterminal e terminal (Logan e de Vos, 2009).

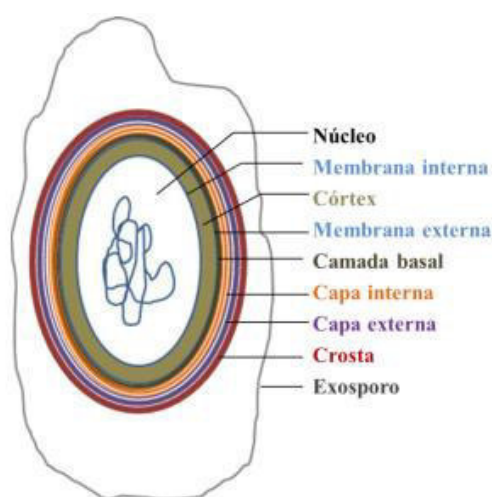


Figura 2 – Estrutura do esporo bacteriano (Retirado de: Cavalcante, 2014).

O esporo bacteriano é o tipo celular mais resistente conhecido. Os esporos bacterianos diferenciam-se das células vegetativas por terem os contornos bem delineados e por resistirem a condições que seriam letais para as células vegetativas (Giorno *et al.*, 2007). Isto significa que em condições de *stress* – tal como a exposição a temperaturas elevadas, pH ácido e concentrações de salinidade elevadas – as bactérias formadoras de esporos produzem esporos, de forma a protegerem-se das condições adversas do meio envolvente (Holt, 1986; Setlow, 2006). Devido a estas características, o esporo bacteriano é a forma microbiana mais resistente ao tratamento térmico, sendo que a forma esporulada é um mecanismo de proteção que permite à bactéria permanecer em estado latente, por um longo período de tempo. Assim que as condições passam a ser favoráveis, os esporos são convertidos novamente em células vegetativas ou, em caso de manutenção das condições de *stress* prevalecerem, os esporos são inativados – esta situação é

verificada, principalmente de acordo com aplicação de um perfil de elevadas temperaturas, tal como na aplicação do processamento térmico (Cavalcante, 2014; Souza, 2014; Morais, 2012).

2.2.1.2. Caracterização das bactérias

Os microrganismos crescem numa ampla faixa de temperatura. No entanto, as bactérias podem ser divididas em 4 grupos, de acordo com o intervalo de temperaturas ótimas de crescimento (tabela 1), o que as distingue fisiologicamente (Adams e Moss, 2000).

Tabela 1 – Classificação das bactérias de acordo com o intervalo de temperaturas que favorece o seu crescimento

Classificação	Intervalo de temperaturas (°C)
Psicrófilos	12 – 15
Psicotróficos	25 – 30
Mesófilos	20 – 45
Termófilos	45 – 75

Apesar das bactérias possuírem temperaturas ótimas de crescimento, nos intervalos anteriormente mencionados, estes microrganismos possuem a capacidade de se manterem viáveis num vasto leque de temperaturas que, no caso dos microrganismos termófilos, podem atingir temperaturas na gama dos 90 °C. É de mencionar, que tanto a temperatura máxima, como a temperatura mínima, podem sofrer ligeiras alterações dentro do mesmo grupo, dependendo da tipologia e das características de termorresistência associadas às bactérias, assim como do ambiente envolvente (Adams e Moss, 2000).

2.2.1.3. Bactérias associadas à deterioração dos alimentos

As bactérias mesófilas são maioritariamente responsáveis pelas infeções bacterianas em seres humanos, visto que estas se encontram à sua temperatura ótima de crescimento – por volta dos 37 °C – no interior do corpo humano (Germano e Germano, 2001). Neste sentido, a quantificação de mesófilos totais indica a qualidade sanitária dos géneros alimentícios e o seu grau de salubridade, pelo que a sua presença em elevada quantidade pode indiciar a existência de: (1) uma anomalia nas condições de armazenamento – nomeadamente ao nível da quebra de

cadeia de frio; (2) o incumprimento do binómio de tempo-temperatura de pasteurização; (3) a transformação da matéria-prima – e.g. pelo corte – aumentando a carga microbiana associada à mesma; e (4) o incumprimento das boas práticas de higienização – fatores estes capazes de propiciar o surgimento de infeções bacterianas constituindo um risco para a segurança alimentar dos produtos comercializados.

De acordo com a literatura, é possível constatar que de facto a maioria das toxinfecções alimentares é provocada por microrganismos pertencentes ao grupo dos mesófilos, tal como as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* (Lerner e Lerner, 2003). De entre as bactérias anteriormente apresentadas, destacam-se as bactérias pertencentes ao género *Bacillus* caracterizadas como Gram-positivas, em forma de bastonete, aeróbias ou anaeróbias facultativas e formadoras de endósporos (Adams e Moss, 2000). A maioria das espécies é mesófila, no entanto algumas podem apresentar-se como psicrófilas e termófilas (Logan e Turnbull, 1999). Devido à sua capacidade para a formação de endósporos, as bactérias deste género apresentam elevados níveis de sobrevivência e desenvolvimento em diferentes ecossistemas e, como tal, podem ser encontradas em diversos ambientes, e.g. o solo, rochas, ambientes aquáticos, vegetação, alimentos e trato gastrointestinal de vários insetos e animais. De entre as espécies estudadas, *B. cereus* e *B. anthracis* têm sido associadas a doenças transmitidas por alimentos (Helgason *et al.*, 2000). Ainda sobre a espécie *B. cereus*, a sua frequência em baixos níveis de contaminação em alimentos, i.e. na ordem de 10^2 Unidades Formadoras de Colónias (UFC)/mL, é considerada aceitável. No entanto, quando o alimento não é submetido a um binómio de tempo-temperatura adequado, os níveis deste microrganismo no alimento podem ascender para 10^7 UFC/mL, o que torna o alimento uma potencial fonte de intoxicações alimentares.

Através do cumprimento do Regulamento (CE) nº 1441/2007 – que fixa os limites microbiológicos para géneros alimentícios – é possível garantir a segurança e a qualidade dos alimentos comercializados, tendo por base o conhecimento das bactérias com maior propensão para se desenvolverem nos mesmos. Atendendo à criticidade das diferentes matérias-primas, em particular frutas e cereais – tal como os frutos vermelhos, o trigo, a aveia e cevada – são vários os microrganismos, em particular bactérias, que podem constituir um problema para a segurança alimentar dos produtos comercializados (tabela 2).

Tabela 2 – Bactérias potencialmente presentes em frutos vermelhos, cereais e produtos complementares

Microrganismo	Alimento	Referência
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>		
<i>Bacillus coagulans</i>		Aneja <i>et al.</i> , 2014; Baptista e
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Sumos de fruta,	Venâncio, 2003; Jensen, 2000;
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Polpas de fruta e	Lucas <i>et al.</i> , 2006; Walker e Philips,
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp.	Fruta enlatada	2008; Wareing e Davenport, 2007;
<i>cremoris</i>		Torrezan <i>et al.</i> , 2000
<i>Propionibacterium</i>		
<i>cyclohexanicum</i>		
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Bacillus sphaericus</i>		
<i>Clostridium botulinum</i>	Cereais	Baptista e Venâncio, 2003;
<i>Clostridium perfringens</i>		Aneja <i>et al.</i> , 2014
<i>Salmonella</i> sp.		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Escherichia coli</i>		Adam e Moss, 2000; Aneja <i>et al.</i> ,
<i>Listeria monocytogenes</i>	Frutos vermelhos	2014; Baptista e Venâncio, 2003;
<i>Salmonella</i> sp.		Sapers <i>et al.</i> , 2006
<i>Staphylococcus aureus</i>		

2.2.2. Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos, vulgarmente denominados como bolores, são fungos pluricelulares que podem desenvolver-se em diversas matrizes, tal como na fruta e nos cereais, provocando assim a sua decomposição. Estes microrganismos desenvolvem-se à temperatura ambiente (25 °C) e resistem à temperatura de refrigeração (Pereira *et al.*, 2010). Estes são constituídos por filamentos de células filiformes, longas e ramificadas, denominadas de hifas, que formam um micélio. Quando atinge a fase de maturação, as hifas formam pequenas esferas, geralmente escuras e visíveis a olho nu. Estas esferas são constituídas por centenas de esporos que, após ruptura da membrana, ficam dispersos no ar e, conseqüentemente, depositam-se em novas

matrizes alimentares (figura 3). Dependendo dos níveis de humidade disponível, os esporos germinam e formam novos micélios (Gupta e Gupta, 2007; Prescott *et al.*, 1996).

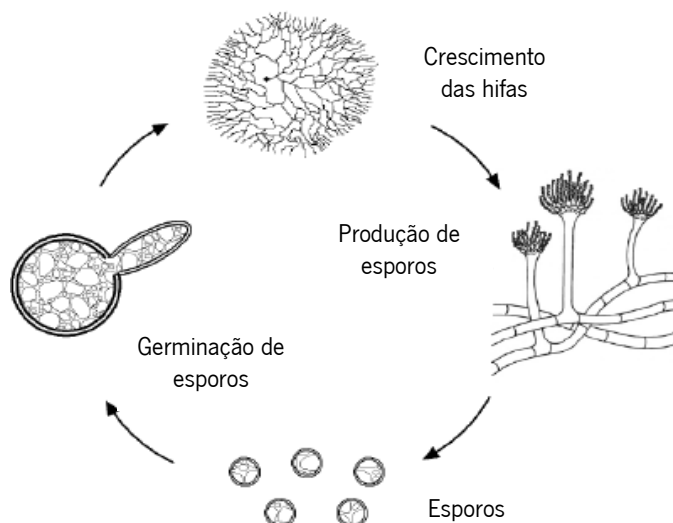


Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de vida dos fungos filamentosos (Adaptado de: *BlackMould*).

Este tipo de microrganismo cresce lentamente em alimentos ácidos e com baixa a_w , graças à produção de esporos ou permanecendo num estado latente. É de salientar que, quando comparados com as bactérias, os fungos filamentosos são capazes de resistir melhor a condições de *stress*, pelo que representam um risco elevado em cereais, frutas, sumos de fruta frescos, vegetais e queijos (Christian *et al.*, 1980; Pelczar *et al.*, 1980). Particularmente, as frutas e cereais são propícias ao desenvolvimento de fungos filamentosos, sendo estes capazes de produzir micotoxinas responsáveis pelo aparecimento de doenças cancerígenas e mutações genéticas (Gava *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2010). Na categoria de fungos produtores de micotoxinas podem destacar-se as seguintes espécies: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus clavatus*, *Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea* – produtor de patulina em frutas – *Penicillium citrinum*, *Penicillium expansum* – produtor de patulina em frutas, pão e enchidos. É de realçar que a maioria dos fungos filamentosos é capaz de produzir micotoxinas termoestáveis que não são totalmente eliminadas durante o processamento, e.g. a patulina é resistente a temperaturas de 75 °C durante 30 min (Gava *et al.*, 2008). Adicionalmente, associada à produção de micotoxinas como a patulina, advém o risco de infeções e, em casos mais graves, a morte (Houbraken *et al.*, 2006). Na tabela 3 destaca-se uma lista fungos filamentosos potencialmente presentes nos produtos-alvo deste projeto.

Tabela 3 – Fungos filamentosos potencialmente presentes em frutos vermelhos, cereais e produtos complementares

Microrganismo	Alimento	Referências
<i>Alternaria</i> sp.		
<i>Botrytis cinérea</i>		Adams e Moss, 2008; Ponce
<i>Cladosporium</i> sp.	Frutos vermelhos	<i>et al.</i> , 2009; Tournas e
<i>Eupenicillium</i>		Katsoudas, 2005
<i>Fusarium</i>		
<i>Alternaria alternata</i>		
<i>Aspergillus</i> sp.		
<i>Aspergillus flavus</i>		Adam e Moss, 2000
<i>Aspergillus parasiticus</i>		Baptista e Venâncio, 2003;
<i>Cladosporium herbarum</i>	Cereais	Fitenborg <i>et al.</i> , 1996
<i>Claviceps purpúrea</i>		ICMSF, 2006
<i>Penicillium</i> sp.		
<i>Penicillium verrucosum</i>		
<i>Wallemia sabi</i>		
<i>Byssochlamys fulva</i>		
<i>Byssochlamys nivea</i>		Aneja <i>et al.</i> , 2014;
<i>Neosartorya fischeri</i>	Sumos e polpas de fruta	Encyclopedia of Food
<i>Paecilomyces variotii</i>	Fruta enlatada	Microbiology, 2014; Fitenborg
<i>Talaromyces flavus</i>		<i>et al.</i> , 1996; Salomão, 2002
<i>Talaromyces macrosporus</i>		

Dos fungos filamentosos apresentados (tabela 3), espécies como *B. fulva* e *N. fischeri* são fungos termorresistentes capazes de resistir a tratamentos térmicos onde são aplicadas temperaturas superiores a 90 °C. Para além destes, destacam-se também outras espécies como a *B. nivea*, *T. flavus* e *Eupenicillium* sp. citados na literatura como fungos termorresistentes (Hoffmann, 2008; Salomão *et al.*, 2008).

Ainda sobre o género *Byssochlamys*, é possível observar o seu desenvolvimento junto ao solo, onde é capaz de crescer sob concentrações muito baixas de oxigénio, bem como produzir enzimas pectinolíticas (Baglioni *et al.*, 1999; Houbraken *et al.*, 2006). Dentro do género, as espécies *B.*

fulva e *B. nivea* constam na literatura como as que possuem maior impacto na deterioração dos alimentos, aliado à produção de micotoxinas, tendo já sido isoladas de matérias-primas, nomeadamente frutas recém-colhidas – como uvas, morangos e ameixas – e em produtos acabados como morangos processados, sumos de frutas e alimentos infantis à base de frutas (Houbraken *et al.*, 2006).

2.2.3. Leveduras

As leveduras apesar de pertencerem ao grupo taxonómico dos fungos, como os fungos filamentosos, caracterizam-se por serem unicelulares e se reproduzirem assexuadamente, e.g. a partir da gemulação, ou então por serem capazes de se reproduzir de forma sexuada através da formação de esporos como representado na figura 4 (Almeida *et al.*, 2010).

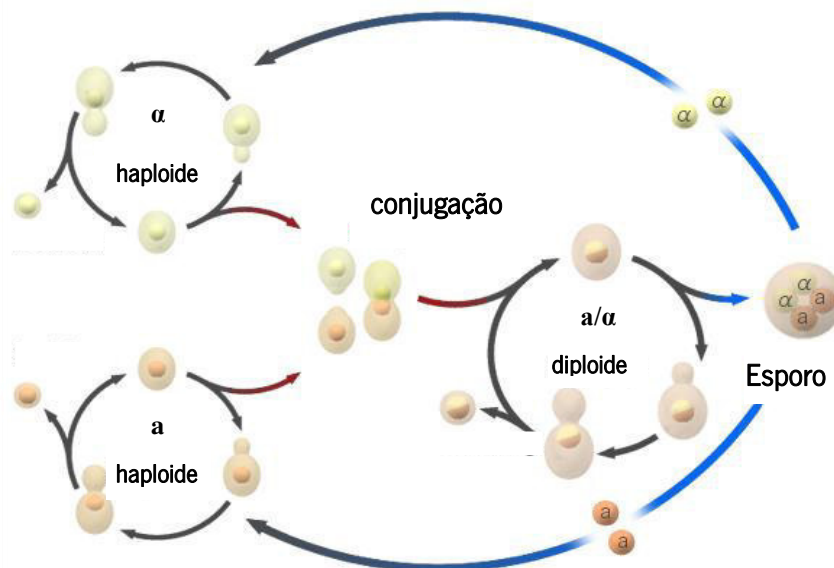


Figura 4 – Representação esquemática do ciclo de vida das leveduras (Adaptado de: *Wikicommons*).

As leveduras possuem capacidade para se desenvolver a temperaturas de refrigeração, no entanto a gama ótima de temperaturas para o seu desenvolvimento situa-se entre os 20 °C e os 30 °C (Gava *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2010). As leveduras podem desenvolver-se na presença, ou na ausência de oxigénio, sendo que o seu desenvolvimento pode ser favorecido por meios com pH ácido (Gava *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2006). Estas podem ser encontradas principalmente em frutas, vegetais e cereais. As leveduras apenas se desenvolvem na superfície externa de frutos sãos e intactos, não existindo desta forma qualquer contaminação interna. Na tabela 4, encontra-se a listagem de leveduras geralmente associadas aos alimentos-alvo deste projeto.

De acordo com os dados bibliográficos disponíveis, observa-se que o nível de contaminação por fungos filamentosos é superior ao nível de contaminação por leveduras (Tournas e Katsoudas, 2005).

Tabela 4 – Leveduras potencialmente presentes em frutos vermelhos, cereais e produtos complementares.

Microrganismo	Alimento	Referências
<i>Candida magnoliae</i>	Sumos de fruta	Aneja <i>et al.</i> , 2014
<i>Candida pelliculosa</i>	Polpa de morango	Torrezan <i>et al.</i> , 2000
<i>Candida sp.</i>		
<i>Cryptococcus albidus</i>		
<i>Pichia farinosa</i>	Farinha de cereais e trigo	Kurtzman <i>et al.</i> , 1970
<i>Pichia fermentans</i>		
<i>Saccharomyces</i>		
<i>microellipsodes</i>		
<i>Kloeckera apiculata</i>		

Por norma, espécies de leveduras dos géneros *Kloeckera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporum* entre outros fazem parte da microbiota natural de leveduras em frutas e cereais (Torrezan *et al.*, 2000; Uboldi Eiroa, 1989).

2.2.4. Vírus e Protozoários

Ainda que as frutas sejam mais suscetíveis à contaminação por fungos filamentosos e leveduras, surtos de doenças entéricas causados por parasitas e vírus têm sido documentados (Pariz, 2011). De acordo com as matérias-primas alvo deste projeto podem ser associados vírus, como o da Hepatite A e Norovírus, nomeadamente no morango e framboesa congelados. Este tipo de microrganismos apresenta elevada resistência a pH ácido e a temperaturas de refrigeração, congelação e pasteurização.

Relativamente aos protozoários foi reportada a presença de *Cyptosporidium parvum*, *Cyclospora cayatenensis* e *Giardia lamblia* em frutos vermelhos. Este tipo de microrganismos

apresenta resistência a baixas temperaturas e a valores baixos de a_w , ainda que seja sensível à pasteurização (FAO/WHO, 2008; Adams e Moss, 2000; Ramos *et al.*, 2013).

Estes microrganismos, assim como as bactérias, as leveduras e os fungos filamentosos representam perigos para a saúde humana. Desta forma sempre que se verifica a possibilidade de um género alimentício apresentar perigo para a saúde humana o *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) emite uma notificação de alerta. O RASFF é o sistema de alerta rápido para géneros alimentícios e alimentos para animais, sendo que permite a partilha rápida e eficiente de informação entre a Comissão Europeia e as autoridades de controlo dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais dos Estados-Membros, sempre que é identificado um perigo para a saúde. Desta forma, é possível agir – nomeadamente pela implementação de medidas preventivas – evitando alertas futuros que, em última instância, podem colocar em risco a saúde do consumidor.

De acordo com o relatório anual de 2014, para a categoria de cereais e outros produtos de pastelaria, entre (1) alertas; (2) informações de atenção; e (3) rejeições na fronteira nacional, ao nível dos estados membros da europa, registaram-se 116 ocorrências; ao passo que, na categoria de frutas e vegetais, as ocorrências foram na ordem das 620. Ainda no caso das frutas, foram registados alertas para a presença de norovírus em framboesas – com origem na Sérvia – com destino à Alemanha, Dinamarca e Suécia. Foram também registados casos de presença de Hepatite A em bagas congeladas, com destino à França, Bélgica, Alemanha, Itália e Suécia (RASFF, 2014).

2.3. Fatores que afetam a estabilidade microbiana

A nutrição humana tem por base alimentos de origem vegetal ou animal, como tal é necessário ter em conta as características associadas a estas matrizes que afetam, ou potenciam, o desenvolvimento microbiano. Os tecidos animais e vegetais, utilizados como fonte de alimento, desenvolveram mecanismos de defesa contra a invasão e proliferação microbiana. O estudo destes mecanismos – naturalmente desenvolvidos por estas matrizes – é importante, na medida em que a aplicação de condições semelhantes pode prevenir o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogénicos nos produtos que derivam destas matrizes.

São vários os fatores que afetam a estabilidade microbiana presente nos géneros alimentícios. Estes podem ser classificados em 2 categorias: fatores intrínsecos e fatores extrínsecos (CRFSFS,

2003; Jay *et al.*, 2005). Nos fatores intrínsecos destaca-se (1) o pH; (2) a a_w ; (3) o potencial de oxidação redução; (4) o conteúdo de nutrientes; (5) a presença de compostos antimicrobianos; e (6) as estruturas biológicas.

2.3.1. pH

Relativamente ao pH necessário para que os microrganismos se desenvolvam, este varia dependendo da tipologia de microrganismos considerada. Apesar de existir um valor de pH ótimo para o crescimento microbiano, estes possuem a capacidade de tolerar uma gama mais alargada de valores de pH, conforme consta na tabela 5 (Baptista e Venâncio, 2003; USDA, 2012).

Tabela 5 – Valores de pH ótimo e os limites máximo e mínimo necessários para o desenvolvimento microbiano

Microrganismo	pH ótimo	pH máximo	pH mínimo
Bactérias	6,5 – 7,5	9,0	4,5
Leveduras	4 – 6,5	8,0 – 9,0	1,5 – 3,5
Fungos filamentosos	4,5 – 7,0	8,0 – 11,0	1,5 – 3,5

Apesar da maioria das bactérias apresentar uma maior taxa de crescimento dentro de variações pequenas de pH e perto da neutralidade (entre 6,5 e 7,5), existem bactérias capazes de se desenvolver a um pH ácido de 4,5 (Baptista e Venâncio, 2003). De igual forma, é de notar que as leveduras e os fungos filamentosos desenvolvem-se em intervalos de pH mais abrangentes do que as bactérias (tabela 5). É de salientar que a acidez presente em muitas tipologias de fruta surge, eventualmente, da necessidade dos tecidos se protegerem contra ataques microbianos, impedindo assim o desenvolvimento microbiano (CRFSFS, 2003).

2.3.2. A_w

A a_w é definida como o rácio entre a pressão de vapor da água do substrato do alimento e a pressão do vapor de água pura à mesma temperatura, como descrito na equação 1 (Scott, 1957).

$$a_w = \frac{p}{p_0}$$

Equação 1

O valor de a_w para a maioria dos alimentos frescos é de 0,99. Em geral, as bactérias requerem valores de a_w superiores para o seu desenvolvimento, quando comparadas com os requisitos apontados para fungos filamentosos e leveduras. Quando o valor de a_w se encontra abaixo do intervalo entre 0,995 e 0,980 a velocidade de crescimento das bactérias diminui. Na tabela 6, encontram-se agrupados os microrganismos, de acordo com o intervalo de a_w dos alimentos em que se verifica o seu desenvolvimento.

Tabela 6 – Intervalo de a_w dos alimentos que favorece o desenvolvimento microbiano (Mossel *et al.*, 1995; Adams e Moss, 2000; Jay *et al.*, 2005)

Microrganismos	Intervalo de a_w
Bactérias patogénicas	0,85 – 0,95
Produção de toxinas	> 0,90
Bactérias deterioradoras	> 0,91
Fungos filamentosos e leveduras	0,60 – 0,91

Apesar dos valores registados na literatura para as bactérias patogénicas, a espécie *S. aureus* é uma exceção, visto que consegue crescer e produzir toxinas em alimentos com valores de a_w inferiores a 0,90. Como mencionado na literatura, o valor limite de a_w para a multiplicação de qualquer microrganismo é de 0,60. É de referir que os valores apresentados são aproximados, visto que diferentes solutos podem inibir de forma distinta o desenvolvimento microbiano em condições idênticas de a_w (tabela 5) (Mossel *et al.*, 1995; Adams e Moss, 2000; Jay *et al.*, 2005).

Em geral, a presença de valores de a_w inferiores aos considerados adequados para o desenvolvimento microbiano, leva ao aumento da extensão da fase de adaptação (fase lag) que, conseqüentemente, diminui a extensão da taxa de crescimento (figura 5).

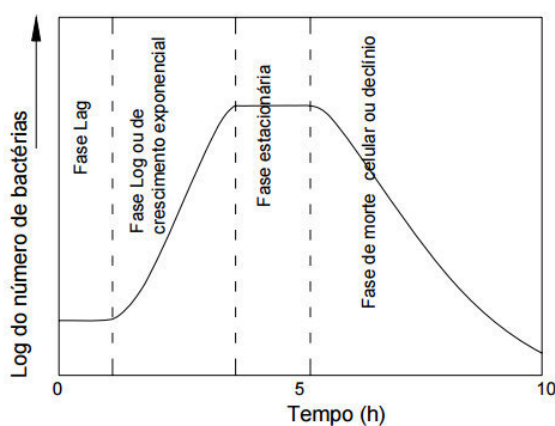


Figura 5 – Curva de crescimento microbiano (Adaptado de: Tortora *et al.*, 2000).

2.3.3. Potencial oxidação-redução

O potencial de oxidação-redução, considerado como fenómeno intrínseco, é um processo que está relacionado com a troca de eletrões entre as substâncias químicas. O potencial de oxidação-redução pode ser definido como a capacidade de um certo substrato ganhar ou perder eletrões, sendo que o substrato que perde eletrões é denominado oxidado e aquele que ganha é designado de reduzido. Este potencial é medido em milivolts e, visto que é afetado pelo pH do substrato, é medido a pH 7 (CRFSFS, 2003).

De acordo com Baptista e Venâncio (2003), os microrganismos podem ser classificados conforme o seu potencial de oxidação-redução (tabela 7).

Tabela 7 – Classificação dos microrganismos de acordo com o seu potencial de oxidação-redução

Classificação	Gama de crescimento (mV)
Aeróbios	+ 300 – + 500
Aeróbios facultativos	- 100 – + 300
Anaeróbios	- 250 – + 100

Na categoria de aeróbios insere-se a maioria dos fungos filamentosos, leveduras e bactérias deteriorantes, assim como algumas bactérias patogénicas. Segundo Jay *et al.* (2005), os sumos de fruta apresentam potencial de oxidação-redução no valor de + 400 mV o que, por si só, promove o crescimento de leveduras e fungos filamentosos.

2.3.4. Composição da matriz: conteúdo em nutrientes

Os microrganismos apresentam a necessidade de um conjunto básico de nutrientes para que o seu desenvolvimento seja favorável. Desta forma, o conteúdo de nutrientes representa um fator crucial, sendo essencialmente constituído pela água, azoto, vitaminas, sais minerais e uma fonte de energia (Jay *et al.*, 2005; Mossel *et al.*, 1995). A ausência de um destes nutrientes, presente nas matrizes alimentares, limita a proliferação microbiana – tendo maior impacto em determinados microrganismos, considerados mais exigentes em termos nutricionais. No caso das frutas, por exemplo, a quantidade de vitamina B é inferior à quantidade existente na carne. Esta carência, constitui um dos principais fatores que leva a que as frutas sejam facilmente deterioradas por fungos filamentosos, ao invés de bactérias.

2.3.5. Compostos antimicrobianos

Como já referido, os alimentos possuem características que lhes permitem proteger-se de ataques microbianos, e.g. pela presença de compostos antimicrobianos, ao nível da sua constituição. Neste contexto, algumas espécies de plantas possuem óleos essenciais com capacidade antimicrobiana; já o ovo possui lisozima – uma proteína capaz de destruir a parede celular das bactérias Gram positivas, assim como a avidina presente na albumina do ovo que atua contra algumas bactérias e leveduras. No caso de frutas como a amora, a ameixa e o morango, o ácido benzóico atua como bactericida e fungicida, sendo eficaz para valores de pH entre 2,5 e 4,5. Note-se que apesar destas características representarem uma mais-valia para o alimento, estes compostos isoladamente não asseguram a estabilidade do alimento. Na verdade, o facto de se encontrarem em concentrações baixas, os compostos antimicrobianos devem ser combinados com outros fatores, tal como o pH e a a_w , para que exerçam o seu poder (Baptista e Venâncio, 2003).

2.3.6. Estruturas biológicas

Por último, nos fatores intrínsecos, destacam-se as estruturas biológicas presentes nos alimentos que funcionam como barreira à proliferação microbiana – e.g. as cascas de frutos, vegetais, ovos e conchas de animais. Para que estas estruturas sejam capazes de prevenir a proliferação microbiana, é necessário garantir a sua integridade, o que nem sempre acontece durante a colheita, transporte e armazenamento dos alimentos a elas associados (Mossel *et al.*, 1995).

2.3.7. Fatores extrínsecos

Relativamente aos fatores extrínsecos são contemplados fatores como (1) a temperatura de armazenamento; (2) a humidade relativa do ambiente; (3) a presença e concentração de gases; (4) a atividade microbiana; e (5) processamento térmico (CRFSFS, 2003; Jay *et al.*, 2005). A temperatura de armazenamento é dos fatores mais relevantes a fim de impedir o desenvolvimento microbiano, visto que a manutenção das temperaturas ótimas de crescimento irá potenciar o seu desenvolvimento (Baptista e Venâncio, 2003). Assim sendo, tanto a refrigeração como a

congelamento mostram-se dois métodos de conservação mais eficazes para o armazenamento dos géneros alimentícios.

A humidade relativa afeta diretamente um dos fatores intrínsecos: a a_w . Sendo que, se um alimento com baixa a_w se encontra num local com alta humidade, a a_w irá aumentar e, por conseguinte, facilitar o desenvolvimento microbiano (Jay *et al.*, 2005).

O dióxido de carbono, o ozono e o oxigénio são gases que podem estar presentes no meio e apresentam-se como gases tóxicos para os microrganismos. O uso destes gases, combinado com o efeito da temperatura, pode ser utilizado como um método para inibir o desenvolvimento microbiano. O uso de ozono ou de dióxido de carbono é aplicado para a conservação de frutas (Baptista e Venâncio, 2003).

O facto de poderem estar presentes diferentes microrganismos no mesmo alimento pode influenciar o seu desenvolvimento, isto porque alguns destes são capazes de produzir certas substâncias – como antibióticos, bacteriocinas e ácidos orgânicos – que podem ter uma função inibitória ou letal para o crescimento microbiano (Jay *et al.*, 2005). Dentro da variedade microbiológica existente – fungos filamentosos, leveduras e bactérias – a alteração dos alimentos, caso se verifiquem as condições favoráveis para o desenvolvimento, é iniciada pelas bactérias. Este facto prende-se com a sua capacidade de proliferar com maior rapidez, seguidas das leveduras que, por sua vez, competem com os fungos filamentosos. As leveduras destacar-se-ão caso estejam presentes em maior número do que as bactérias, ou caso as condições não permitam o crescimento bacteriano. Em contrapartida, outros cenários podem ser observados, nomeadamente o crescimento microbiano simultâneo sem favorecimento ou inibição entre si, a partir da fermentação e decomposição de um determinado alimento (Gava *et al.*, 2008).

Relativamente ao processamento térmico, a aplicação de tratamentos como a pasteurização e a esterilização, assumem especial importância na medida em que permitem a inativação microbiana tanto em alimentos prontos para consumo, como em alimentos processados.

2.4. Processamento térmico

De forma a garantir a realização de um processamento alimentar eficaz, capaz de garantir a segurança dos alimentos durante o tempo de vida útil definido é necessário tomar em consideração os microrganismos passíveis de ter mais propensão para a contaminação de determinadas matrizes alimentares (Baptista e Venâncio, 2003). Como método para reduzir a

contaminação microbiana associada a estas, a pasteurização é o tratamento mais utilizado assegurando de igual forma a segurança dos alimentos. A pasteurização é capaz de inativar a maioria dos microrganismos, no entanto, poderá ser ineficiente para a inativação de fungos termorresistentes, bem como de algumas bactérias formadoras de esporos. Desta forma, é necessário ajustar o binómio de tempo-temperatura aplicado para garantir o controlo da carga microbiana evidenciada. No entanto, o aumento deste binómio implica, muitas vezes, a alteração das características organolépticas do produto – nomeadamente, pelo escurecimento do produto, assim como o desenvolvimento de sabores e odores desajustados, bem como perdas nutricionais significativas. Aliás, inicialmente, segundo reportado na literatura, a pasteurização de sumos de fruta era realizada a baixas temperaturas por longos períodos de tempo (63 °C, 30 min). No entanto, devido à extensão do tratamento térmico, as qualidades sensoriais e nutricionais eram diminuídas (Shaw *et al.*, 2000).

Assim sendo, os microrganismos produtores de esporos termorresistentes tornam-se uma preocupação nos produtos processados por pasteurização. Os esporos produzidos por estes microrganismos podem sobreviver ao tratamento térmico aplicado, conduzindo a situações onde a produção de toxinas passa a ser um risco para a segurança alimentar dos produtos comercializados. Desta forma, a solução passa pela combinação de métodos de conservação, sendo que no caso das polpas de frutas combina-se a pasteurização com a congelação.

A título de exemplo e segundo Benamara *et al.* (2016), a eliminação de esporos da espécie bacteriana *B. cereus* – microrganismo representado na figura 6 – apresenta valores de $D_{120^{\circ}\text{C}}$ de 7,1 min e $D_{110^{\circ}\text{C}}$ de 21,5 min, sendo que o valor de z varia entre 7,7 °C a 21,3 °C, num meio com pH mínimo entre 4,7 e 5,1 e a_w entre os 0,940 e os 0,951. Estes dados demonstram a elevada termorresistência dos esporos desta espécie (Vaerewijk *et al.*, 2001).

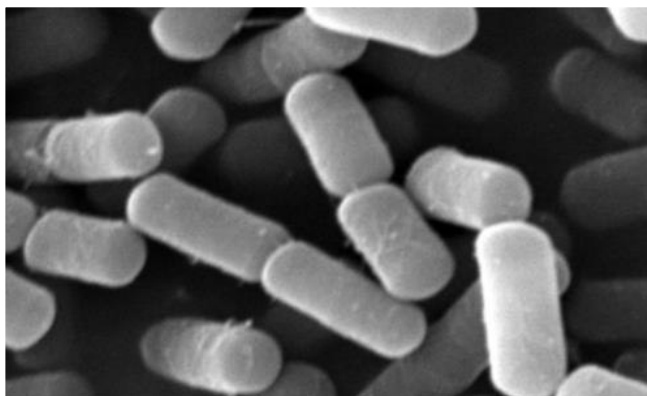


Figura 6 – Estrutura de *B. cereus* visualizada através de microscopia eletrônica de varrimento (Retirado de: Phung, 2013).

2.5. Processamento térmico: Fatores que afetam a termorresistência microbiana

A presença de diferentes espécies microbianas na mesma matriz alimentar, não implica a mesma facilidade de inativação destas quando expostas a altas temperaturas. Dependendo dos fatores intrínsecos anteriormente abordados (subcapítulo 2.3.), as espécies podem apresentar resistência a condições de *stress* distintas e, conseqüentemente, a diferentes padrões de temperatura.

2.5.1. A_w

A resistência térmica microbiana aumenta com a diminuição da humidade ou da a_w . Tal encontra-se descrito na literatura por Gaillard *et al.* (1998), onde se reporta que para a eliminação de esporos de *B. cereus* para valores de a_w de 1,0 e de pH igual a 6,5, o $D_{95^\circ\text{C}}$ é 2,39 min; ao passo que se o valor de a_w for 0,86, para o mesmo valor de pH, o $D_{95^\circ\text{C}}$ passa a ser de 13,8 min. O aumento da resistência térmica aliada à diminuição da a_w ocorre devido à desnaturação proteica, mais rapidamente em ambiente hidratado do que em ambiente desidratado. A presença de água permite a quebra térmica das ligações peptídicas, um processo que requer mais energia na ausência de água e que por isso aumenta a resistência ao calor. Adicionalmente, deve-se ter em conta a presença de compostos microbianos inibidores, como antibióticos e dióxido de enxofre (SO_2) que diminuem a resistência térmica microbiana (Jay *et al.*, 2005).

2.5.2. Composição da matriz

A composição da matriz é um fator que afeta a resistência térmica dos microrganismos, visto que quanto maior o teor em gorduras e proteínas na matriz alimentar, maior será a termorresistência. A presença de hidratos de carbono é de igual forma relevante, visto que estes diminuem a a_w , nomeadamente pela presença de açúcares, tais como a sacarose, a glicose ou o sorbitol – aumentando a termorresistência microbiana. A título de exemplo, a adição de fruta, rica em sacarose, ao iogurte tem como principal consequência o aumento da quantidade de hidratos de carbono disponíveis que, por sua vez, permitem o crescimento e desenvolvimento de uma flora

microbiana deteriorante mais diversificada (Adams e Moss, 2000). De igual forma, os sais – que constituem a matriz alimentar – influenciam a resistência térmica microbiana, dependendo do tipo e concentração a eles associados. Alguns sais têm efeito protetor, enquanto outros tornam as células mais sensíveis ao calor, visto que diminuem a a_w (Carvalho, 2010).

A presença de proteínas também influencia a termorresistência microbiana, na medida em que promove um efeito protetor sobre as mesmas. Assim sendo, um alimento com alto conteúdo proteico tem de ser processado a temperaturas superiores às requeridas para processar um alimento com baixo conteúdo proteico.

2.5.3. pH

O pH é outro dos fatores considerados mais importantes para evitar o desenvolvimento microbiano. Na presença de um meio mais ácido – no caso de bactérias este valor é 4,5 e no caso de leveduras e fungos filamentosos é 1,5 – o crescimento microbiano é inibido, constituindo a adição de ácidos fracos ou o uso da fermentação láctica, exemplos de formas de permitir aumentar a taxa de crescimento microbiano, quando desejável (Jay *et al.*, 2005).

2.5.4. Curva de crescimento

A fase de crescimento em que os microrganismos se encontram é outro dos fatores que interfere na termorresistência, sendo que esta é mais alta quando estes se encontram na fase estacionária (figura 5) – constatando-se que os esporos mais velhos apresentam maior termorresistência do que esporos mais novos (Ng *et al.*, 1969).

A termorresistência apresenta um aumento diretamente proporcional à temperatura de crescimento, especialmente no caso dos microrganismos formadores de esporos. Tal pode ser explicado pela seleção genética que favorece o crescimento dos microrganismos mais termorresistentes. Assim sendo, no caso particular das bactérias, as pertencentes ao grupo dos termófilos, geralmente, apresentam maior termorresistência, quando comparadas com aquelas que são consideradas mesófilas. O mesmo se aplica quando se comparam as bactérias formadoras de esporos com as bactérias em estado de célula vegetativa. Por norma, bactérias Gram positivas são mais resistentes que bactérias Gram negativas. Relativamente às leveduras e fungos filamentosos, estes apresentam sensibilidade ao tratamento térmico,

à exceção destes últimos que – graças à existência de espécies termorresistentes – podem sobreviver às condições do processamento térmico (Jay *et al.*, 2005).

De acordo com a literatura, quanto maior a temperatura aplicada, durante o tratamento térmico, menor será o tempo necessário para permitir a sua inativação; no entanto esta premissa pressupõe que os efeitos são imediatos e que não são mecanicamente obstruídos ou prejudicados. (Jay *et al.*, 2005).

2.6. Processamento térmico: Parâmetros associados à pasteurização

Associados à pasteurização e ao binómio de tempo-temperatura aplicado estão alguns conceitos que caracterizam a inativação microbiana, entre eles destacam-se os parâmetros de cinética de inativação térmica: o valor de D_T e z .

2.6.1. Valor de D_T

O valor de D representa o tempo necessário para que ocorra a redução de um ciclo logarítmico na população microbiana ou, por outras palavras, o tempo necessário para reduzir em 90 % os microrganismos presentes numa determinada matriz – a uma dada temperatura (figura 7). Este valor é calculado em min e apresentado segundo o $\text{Lg}(N/N_0)$ em função do tempo.

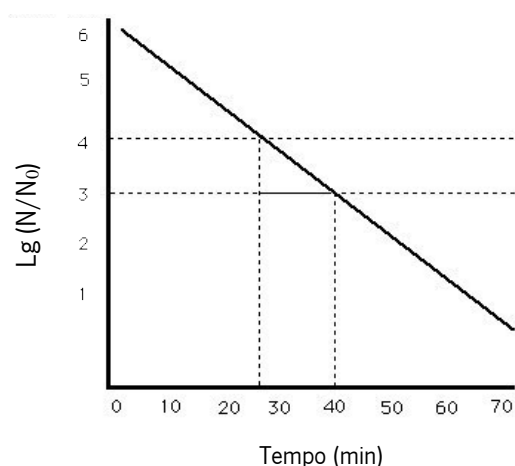


Figura 7 – Lg de bactérias viáveis em função do tempo (min) (Adaptado de: University of Guelph, 2016).

2.6.2. Valor de z

O valor de z representa o aumento de temperatura (°C) necessário para reduzir um ciclo logarítmico, representado graficamente através da figura 8.

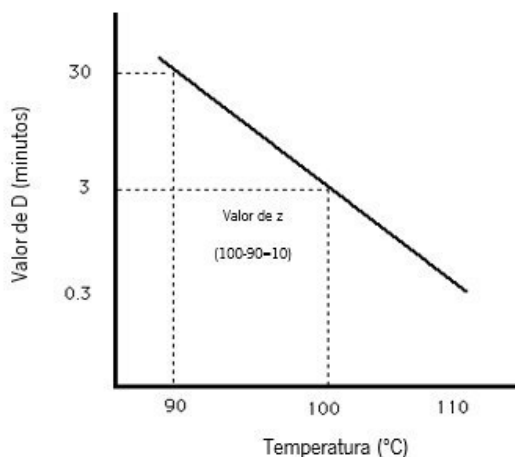


Figura 8 – Valor de D em função da temperatura (°C) (Adaptado de: University of Guelph, 2016).

Estes parâmetros são característicos de cada espécie microbiana e, de acordo com a matriz alimentar, apresentam valores distintos (tabela 8). É possível constatar que o valor de D_T diminui com o aumento da temperatura, bem como algumas bactérias formadoras de esporos apresentam elevada termorresistência, i.e. para ocorrer a redução de um ciclo logarítmico numa população de *Bacillus stearothermophilus* é necessário a exposição do alimento a um binómio de tempo-temperatura de pasteurização de 115 °C durante 9 min – variando de acordo com o número de redução decimal.

Tabela 8 – Valores de D e z para esporos de *Bacillus* e de alguns fungos filamentosos (Adaptado de: Batt e Tortorello, 2014; Jay *et al.*, 2005; Nakayama *et al.*, 1996)

Espécie	Valor de D (min) para diferentes temperaturas (°C)							Valor de z (°C)
	85	90	95	100	105	110	115	
<i>B. cereus</i>				3 – 200		0,03 – 2,40		35,9
<i>B. stearothermophilus</i>					101	30	9,0	9,50
<i>B. coagulans</i>			24	4,6	1,0			7,20
<i>B. subtilis</i>		12	2,7	0,9				8,90
<i>B. licheniformis</i>	23	11	2,7					10,70

Tabela 8 (continuação) – Valores de D e z para esporos de *Bacillus* e de alguns fungos filamentosos (Adaptado de: Batt e Tortorello, 2014; Jay *et al.*, 2005; Nakayama *et al.*, 1996)

Espécie	Valor de D (min) para diferentes temperaturas (°C)						Valor de z (°C)
	85	90	95	100	105	110	115
<i>B. megaterium</i>	13	2,6	0,8				8,30
<i>N. fischeri</i>	35,25	3,90					4,00
<i>T. flavus</i>	2,2 – 5,4						5,4 – 16,6
<i>B. vulva</i>	8,10						6,30

2.6.3. Fundamentos teóricos

A curva de resistência térmica representada na figura 9 é específica para cada microrganismo e representa a sua resistência relativa a diferentes temperaturas.

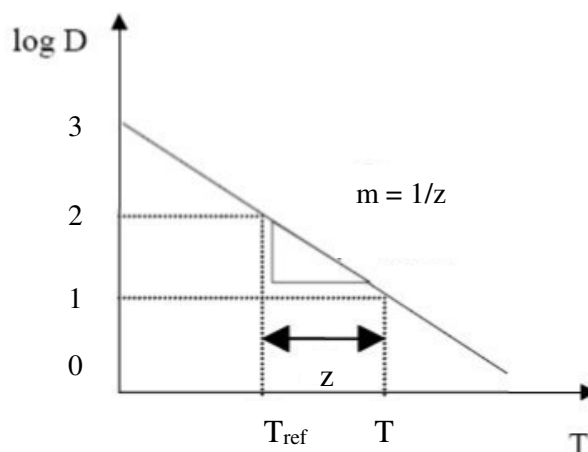


Figura 9 – Representação gráfica de uma curva de resistência térmica (Adaptado de: Fontana, 2009).

Esta curva de resistência térmica apresenta no eixo das ordenadas a escala logarítmica do tempo de redução decimal, valor de D, enquanto nas abcissas se encontra a temperatura (T). Através da figura 9 é possível estabelecer a seguinte relação:

$$\frac{\lg D - \lg D_{ref}}{T - T_{ref}} = -\frac{1}{z} \quad \text{Equação 2}$$

Na equação 2, T_{ref} representa a temperatura necessária para que o tempo D se reduza à décima parte do seu valor inicial ($\lg D_{ref}$) (Fontana, 2009). Por outras palavras, a redução decimal

representa a diminuição da população microbiana viável em 90 %. Rearranjando a equação é possível obter a fórmula para o cálculo de binómios de tempo-temperatura de pasteurização:

$$D = D_{ref} \times 10^{\frac{T_{ref}-T}{z}} \quad \text{Equação 3}$$

Com o auxílio da equação 3 e através do estudo do comportamento dos microrganismos selecionados torna-se possível a simulação de binómios de tempo-temperatura de pasteurização para uma melhor aplicação industrial.

2.7. Importância da microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva foi relatada pela primeira vez em 1922 para descrever a morte térmica dos esporos da espécie *Clostridium botulinum*, através de um modelo matemático que estabelecia a relação entre a taxa de mortalidade da presente bactéria, de acordo com a aplicação de um determinado tempo a uma temperatura constante (Oliveira *et al.*, 2013). Neste sentido, o interesse pela microbiologia preditiva intensificou-se a partir da década de 80, onde a ocorrência de toxinfecções alimentares com regularidade alertou a população para a necessidade da produção de alimentos seguros.

A microbiologia preditiva descreve, de forma quantitativa, os efeitos dos fatores intrínsecos e extrínsecos – abordados na secção 2.3. – no desenvolvimento microbiano. Como resultado, são elaborados modelos matemáticos capazes de gerar curvas de crescimento e/ou inativação microbiana. Estes modelos têm como objetivo a sua aplicação numa vasta gama de alimentos, através da sua extrapolação, assumindo que as populações de microrganismos sob as mesmas condições ambientais, e tipologia de matriz, vão reproduzir o mesmo comportamento. De entre as condições extrínsecas aplicadas, destacam-se as variações em parâmetros como o pH, o tempo de armazenamento e a a_w , inerentes aos alimentos – de forma a diminuir a contaminação dos produtos alimentares.

A microbiologia preditiva constitui uma área que se encontra em desenvolvimento, visto que os modelos utilizados são frequentemente obtidos através de simulações laboratoriais que, aquando da sua extrapolação para o contexto industrial, sofrem variações significativas. A nível industrial, a variação destes parâmetros acaba por ocorrer, apesar do controlo rigoroso, o que dificulta a aplicação dos modelos preditivos (Duarte, 2011). Apesar destas limitações, os modelos preditivos apresentam inúmeras vantagens ao nível da microbiologia alimentar, tais como: (1) a

descrição do comportamento de microrganismos em diferentes condições físico-químicas; (2) permite a previsão das alterações a nível microbiológico, durante o armazenamento do produto; (3) avalia a eficiência da higiene durante a etapa de processamento e distribuição; (4) determina o efeito de possíveis falhas nas condições de armazenamento; (5) prevê a segurança microbiológica de um produto alimentar, assim como o seu tempo de prateleira; e (6) auxilia na análise de perigos e pontos críticos de controlo.

Para o presente projeto, o estudo de frutas e vegetais representa uma mais valia para o conhecimento científico uma vez que os dados relativos a estas matrizes são escassos.

É de salientar que, apesar das inúmeras vantagens da microbiologia preditiva, esta não pode substituir as análises microbiológicas realizadas aos alimentos, sendo que funciona como uma ferramenta adicional na procura pela garantia da segurança alimentar (Oliveira *et al.*, 2013).

2.8. Processamento Alimentar: Uma Visão Industrial

2.8.1. Processo produtivo: FRULACT

O processamento alimentar é o conjunto de métodos físicos, químicos e/ou biológicos capazes de transformar as matérias-primas em produtos alimentares utilizados para o consumo humano. No que concerne às matérias-primas, são várias as etapas de transformação a que as mesmas são sujeitas até que seja feita a sua incorporação no produto final, tal como se encontra ilustrado na figura 10.

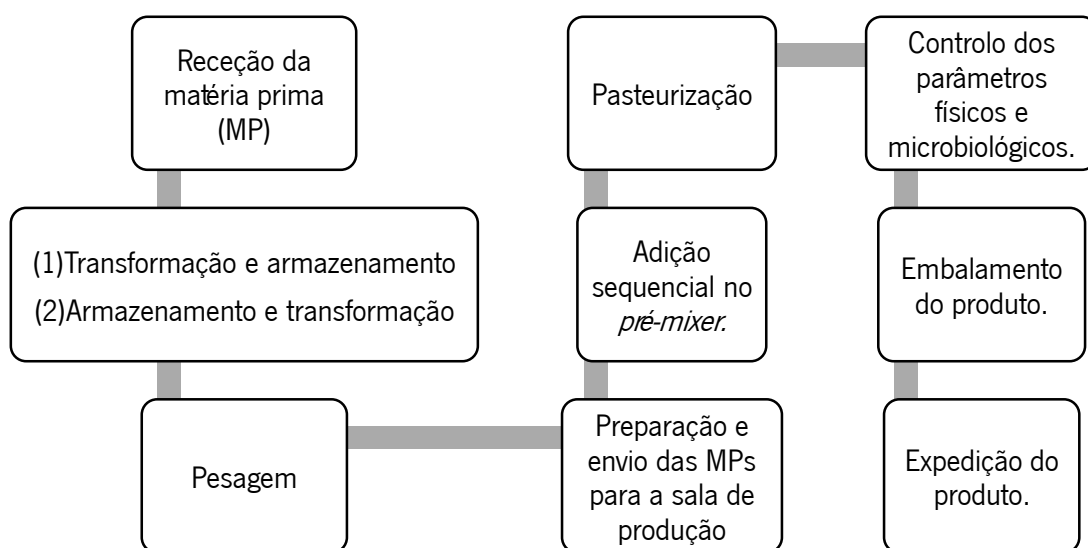


Figura 10 – Esquemática das etapas desde a receção da matéria-prima até à expedição do produto acabado.

2.8.2. Receção, transformação e armazenamento de matérias-primas

No momento de chegada à fábrica, é atribuído um código a cada matéria-prima através do qual, caso haja necessidade, é possível ativar o sistema de rastreabilidade. Este sistema permite diagnosticar ocorrências tanto ao nível da produção – identificando os códigos utilizados em diferentes formulações para elaboração dos preparados de fruta – como também funciona como uma ferramenta útil para a avaliação da qualidade das mesmas junto dos fornecedores. A rastreabilidade tem como principais vantagens a proteção da saúde pública e criar confiança nos consumidores cada vez mais exigentes, aumentando assim a credibilidade das empresas.

Caso seja necessário, a matéria-prima pode ser sujeita a métodos físicos, entre eles, moagem, trituração ou corte, atendendo às necessidades que cada formulação aporta – mistura das proporções específicas de cada ingrediente necessário para a realização de um determinado preparado. Após a transformação, as matérias-primas podem ser prontamente utilizadas ou acondicionadas sob congelação, refrigeração ou conservação à temperatura ambiente.

2.8.3. Etapa de ingredientação, pasteurização e embalagem

Quando a matéria-prima é necessária para a formulação de um preparado, esta é pesada na sala dos secos, frutas ou alergénios – dependendo da sua tipologia – e enviada para a sala de produção. Na sala de produção, as matérias-primas, e outros ingredientes, são adicionados sequencialmente no *pré-mixer*. Nesta etapa de ingredientação, a adição dos ingredientes é acompanhada do cumprimento de um binómio de tempo-temperatura, sob agitação. De seguida, o produto segue para o pasteurizador, onde é aplicada a temperatura a que o produto deverá ser sujeito, acompanhado do cumprimento do tempo de permanência durante o *holding*, de acordo com o caudal definido.

Após o final da produção, são verificados os parâmetros físico-químicos e microbiológicos para avaliar se o produto se encontra de acordo com os requisitos do cliente. Os preparados de fruta são caracterizados em termos de propriedades físico-químicas, nomeadamente:

- a_w : essencial na indústria alimentar, visto que representa um papel vital na estabilidade do produto, bem como na manutenção da qualidade e segurança do produto alimentar durante o seu tempo de prateleira – sendo possível prever o comportamento microbiano face à disponibilidade de água presente na matriz;

- °Brix: a escala de Brix é utilizada para medir a quantidade aproximada de açúcares sendo que a realização de testes laboratoriais para avaliar a carga microbiana em preparados com diferentes °Brix permite comparar a influência que a quantidade de açúcares tem na carga microbiana dos produtos alimentares. O °Brix é inversamente proporcional ao valor de a_w , sendo que elevado °Brix traduz-se em baixa a_w ;

- pH: característica importante no produto visto que valores de pH mais ácidos impedem o crescimento da maioria dos microrganismos.

Depois de realizadas as análises necessárias e de verificação que o produto se encontra de acordo com as especificações requeridas este é expedido.

Os contentores de aço inoxidável utilizados para o embalamento do produto acabado são devolvidos pelos clientes, seguindo para a zona de lavagem onde, após uma pré-lavagem, são inseridos nos terminais de CIP (*Cleaning In Place*). Após esta fase, são transferidos para a zona de SIP (*Sterilization In Place*) onde são submetidos a um processo de esterilização.

2.9. Preparados de fruta na Indústria Alimentar

Num mercado alimentar cada vez mais competitivo e exigente, é necessário que as empresas apresentem novos produtos, de diferentes sabores, cores e texturas, de forma a responderem às necessidades dos diferentes consumidores (AJAP e Agri-Ciência, 2009).

Através do desenvolvimento da tecnologia e do conhecimento especializado, surgem os preparados de fruta capazes de aportar valor não só à produção de iogurtes, como também a outros produtos semelhantes como gelados e produtos de pastelaria. Estes produtos representam uma nova forma de ingerir fruta, numa sociedade com cada vez menos tempo disponível para a confeção de refeições saudáveis, procurando por produtos com maior conveniência, que representem uma opção saudável e com alto valor nutritivo. O consumidor acaba assim por ingerir fruta sem ser necessário lavar, descascar ou ter cuidados para que esta não se deteriore (Silva, 2014).

Uma das principais vantagens associada a esta tipologia de preparados prende-se com o facto de ser possível – de acordo com a sazonalidade da fruta – a produção em elevadas quantidades, acompanhada de um tempo de armazenamento prolongado, preservando sempre as características físico-químicas inerentes ao preparado. Desta forma, é possível acompanhar as necessidades do mercado, ao longo de todo ano.

Devido à sazonalidade da fruta e à sua alta perecibilidade é necessário apostar no desenvolvimento de processos tecnológicos, capazes de colocar no mercado estes produtos durante o ano inteiro e em países em que determinados frutos não se produzem e que, devido às longas distâncias, não seja possível a sua comercialização (Batalha e Buhain, 2007). Por estas razões, o mercado dos preparados de fruta encontra-se em constante evolução e atualização, de modo a corresponder às expectativas do consumidor.

2.9.1. Composição genérica

A formulação dos preparados de fruta utiliza determinados ingredientes no sentido de otimizar as suas características, quer nutricionais, quer físico-químicas, tal como polpas de frutas, corantes, aromas, açúcares, amido e pectinas, entre outros aditivos alimentares listados na tabela 9.

Tabela 9 – Aditivos alimentares utilizados em preparados de fruta

Aditivo alimentar	Função	Exemplos
Acidulante	Aumentar a acidez ou intensificar o sabor dos alimentos	Ácido cítrico, Ácido láctico
Agentes de firmeza	Manter as matrizes firmes	Citrato tricálcico, Fosfato tricálcico
Antioxidante	Retardar as ações oxidativas nos alimentos	Ácido cítrico, Ácido sórbico,
Aromatizante	Conferir ou reforçar o sabor dos alimentos	Artificial ou Natural
Conservantes	Impedir ou retardar a deterioração dos alimentos	Ácido benzoico, Ácido sórbico
Corante	Intensificar ou reforçar o sabor dos alimentos	Artificial ou Natural
Emulsificante	Permitir a mistura de duas ou mais substâncias imiscíveis	Carregenina, Pectina, Goma Xantana, Goma de Alfarroba
Espessante	Aumentar a viscosidade do alimento	Goma Guar
Estabilizante	Manter a estabilidade da matriz	Amidos modificados

2.9.2. Matrizes de Fruta e Cereais

Para a realização do presente projeto de dissertação selecionaram-se as bagas e os cereais como matérias-primas de estudo, devido à criticidade a elas associada. Esta constatação é suportada pela: (1) análise cuidada dos limites microbiológicos constantes nas fichas técnicas provenientes dos fornecedores; (2) o histórico de análises microbiológicas; (3) os dados bibliográficos que evidenciam a presença de determinados microrganismos considerados patogénicos, presentes nas matrizes referenciadas; e (4) a percentagem de utilização nas demais formulações que contemplam a sua incorporação.

Para além dos fatores acima identificados, a escolha do estudo destas matérias-primas, também é suportada pela sua composição nutricional. Por um lado, as frutas contêm diversas vitaminas, açúcares e outros componentes orgânicos que poderão permitir o desenvolvimento microbiano (tabela 10). Por outro lado, os cereais, são ricos em fibras e hidratos de carbono – nomeadamente celulose – sendo capazes de ser utilizados pelos microrganismos permitindo igualmente o seu desenvolvimento. No entanto, o controlo do pH permite inibir o desenvolvimento microbiano, ainda que os fungos filamentosos e as leveduras apresentem uma maior tolerância a pH mais ácido ($pH_{\text{mínimo}}=1,5$) (Baptista e Venâncio, 2003).

Tabela 10 – Composição nutricional de frutos vermelhos e cereais

Fruto	Água	Carboidratos	Proteína	Lípidos	Cinza	Fibra
Amora	84,8	12,5	1,2	0,5	1,0	–
Framboesa	80,6	15,7	1,5	0,6	1,6	–
Morango	89,9	8,3	0,8	0,5	0,5	–
Aveia	–	69,8	11,6	5,2	2,9	10,4
Cevada	–	80,7	10,8	1,9	2,2	4,4
Trigo	–	78,4	14,3	2,3	2,2	2,8

(Adaptado de Jay *et al.*, 2005; Mlyneková *et al.*, 2014)

Os fungos filamentosos e leveduras constituem uma preocupação para as indústrias alimentares, na medida em que a sua presença contribui para a deterioração dos produtos alimentares. Relativamente aos fungos filamentosos, estes apresentam capacidade para produzir micotoxinas – metabolitos secundários – que, para além de lhes atribuir uma vantagem

competitiva na presença de outros microrganismos, podem ser mutagénicas e carcinogénicas, quando ingeridos pelo consumidor.

Relativamente aos cereais, é expectável que a flora microbiana presente seja proveniente do solo e das condições de armazenamento. Estes apresentam elevado teor em proteínas, hidratos de carbono e baixa atividade da água o que, por si só, inibe o crescimento microbiano. No entanto, as espécies bacterianas principalmente pertencentes ao género *Bacillus* e fungos filamentosos de diversos géneros acabam por se desenvolver no produto. Assim sendo, a deterioração em cereais pode ser conduzida por bactérias aeróbias formadoras de esporos cuja sua capacidade para produzir amilase permite-lhes utilizar as farinhas como fonte de energia (Jay *et al.*, 2005).

Devido aos danos que estes produtos podem causar na saúde do consumidor é necessário realizar um controlo rigoroso do processo produtivo, bem como do produto acabado, realçando a manutenção da qualidade microbiológica – através de métodos que possibilitem a inibição ou a inativação dos microrganismos, como por exemplo a congelação ou pasteurização, respetivamente (Sebastiany *et al.*, 2009).

2.9.3. Mercado Global

O mercado dos preparados de fruta encontra-se em rápida ascensão. A procura por alimentos saudáveis e prontos a consumir é uma tendência cada vez mais alinhada com os países desenvolvidos. A capacidade dos preparados de fruta para serem incorporados em diversos produtos, torna-os um produto cada vez mais procurado por empresas da indústria alimentar.

O mercado dos preparados de fruta divide-se entre: (1) a venda direta ao consumidor – através de restaurantes e supermercados; e (2) a venda entre empresas, *Business-to-business*, pela incorporação dos preparados em diversas aplicações, tal como iogurtes, geleias, compotas, gelados, alimentos infantis, entre outros. Na verdade, o encontro entre a indústria alimentar e as necessidades do consumidor resultam na criação de novos segmentos de mercado onde podem ser incluídos os preparados de fruta, como por exemplo os produtos proteicos – destinados a desportistas – e produtos dietéticos como os sumos *detox* e os *smoothies*.

Apesar dos vários produtos, constituídos por fruta, colocados à disposição do consumidor, a maioria dos Europeus não alcança o nível recomendado pela OMS para o consumo diário de frutas e vegetais (≥ 400 g/ adulto). O processamento alimentar através de metodologias naturais é valorizado juntos dos consumidores, permitindo criar uma oportunidade de negócio para produtos

de valor acrescentado. Os preparados de fruta representam um caso de sucesso no mercado, na medida em que permitem o acesso do consumidor, por um lado, a produtos de elevada qualidade – os consumidores são bastante sensíveis às características físico-químicas e nutricionais apresentadas pelos produtos industrializados – e por outro lado, a produtos atrativos, criativos e convenientes que captam a atenção do consumidor (Agrocluster, 2015).

O aumento exponencial da produção de frutos vermelhos – amora, framboesa, mirtilo e morango – é uma consequência do interesse manifestado pelo consumidor. Apesar do aumento da produção destes alimentos, o seu consumo não aumentou de forma drástica, tal pode estar relacionado com o preço associado aos mesmos. As bagas apresentam características benéficas para o consumidor – nomeadamente a capacidade antioxidante cientificamente comprovada e efeitos positivos para as funções neurológicas e cognitivas. Assim sendo, os preparados de fruta podem representar uma alternativa ao consumo direto de frutos vermelhos, com um tempo de vida útil prolongado. É de salientar que, o preço do preparado de fruta é mais competitivo face à venda avulsa destes frutos, bem como o seu consumo pode ser realizado independentemente da época sazonal (Velo, 2016).

Relativamente, à formulação de preparados de cereais, a combinação de diversos cereais representa uma mais valia para o consumidor, uma vez que alia as suas várias propriedades benéficas num só alimento. Entre estas, destacam-se: (1) o elevado teor em fibras solúveis, o que auxilia na redução dos níveis de colesterol no sangue – apresentado pelo farelo de aveia; (2) o bom funcionamento gastrointestinal; (3) a capacidade para aumentar a saciedade; e (4) o efeito protetor do intestino graças às fibras dos grãos de cereais (Carvalho, 2014).

2.9.4. Aplicação

2.9.4.1. Produtos lácteos dosificados com preparados de fruta

O iogurte é obtido após a fermentação do leite pelas bactérias *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Fuchs *et al*, 2005). É considerado um produto benéfico para a saúde por representar uma importante fonte de cálcio, assim como diversas características nutritivas graças aos fermentos lácteos e, por isso, tem elevada relevância nos hábitos alimentares diários. Segundo dados do estudo do “Consumidor 2003” da Marktest, o Porto representa o local onde a taxa de consumo é maior (67,9 %). O estudo demonstrou que o consumo de iogurte é superior no sexo feminino, cerca de 77 % face aos 55 % do sexo masculino (Vale, 2010).

Devido à relevância que esta matriz tem para os hábitos alimentares dos consumidores, surgiu a necessidade da indústria alimentar responder às expectativas do mercado pela conceção de novas tipologias de iogurte. Nesse sentido, surgiram iogurtes magros, gordos, cremosos, de soja, funcionais, biológicos, entre outros, na forma de iogurte líquido ou sólido. Adicionalmente, foram também criados iogurtes com diferentes aromas, tipologias de fruta e variedades de pedaços – permitindo ao consumidor ter uma maior diversidade de opções no momento do consumo.

No sentido de explorar, misturar e investigar novos sabores e novas frutas surgiram os preparados de fruta. O uso de preparados de fruta no iogurte apresenta diversas vantagens para o produtor de iogurte, tal como:

- a redução de riscos de contaminação, uma vez que a adição direta – à base de iogurte – de alguns ingredientes, tais como os aromas, corantes e fruta não pasteurizada representa um elevado risco de contaminação;
- a consistência devido aos espessantes presentes na sua fórmula, auxiliando assim na manutenção da dispersão de proteínas e ajuda na prevenção da separação de fases;
- a atribuição de cor e aroma ao iogurte;
- permite a agregação de vários ingredientes num único preparado, reduzindo o espaço necessário para o seu armazenamento (Ritter, 2007).

2.9.4.2. Outras aplicações

A incorporação dos preparados de fruta não se limita a matrizes láteas, sendo que estes podem ser por e.g. ser introduzidos em compostas e geleias. Enquanto que a compota é uma conserva elaborada com frutos – submetidos a cozedura em pedaços, em açúcar, com água ou sumo de fruta – na geleia, os frutos são cozidos com açúcar aliados a uma quantidade superior de líquido, tal como água, chá, sumo de fruta ou vinho, sendo posteriormente coada.

A produção de compostas e geleias é uma alternativa para a utilização de frutas que não atingem o mínimo da classificação em termos de tamanho e peso (Furlaneto, 2015). As diferentes combinações de frutas conferem sabores característicos, o que os torna um produto com elevada aceitação no mercado nacional e internacional. A nível nacional, a produção deste tipo de preparados aumentou 10 % em 2010 (Costa, 2011).

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3.1. Preparação de material

Previamente à elaboração das análises microbiológicas foi preparado o material a utilizar, como por exemplo os meios de cultura e os meios de suspensão – nomeadamente a preparação de tubos de ensaio com a respetiva diluição. A preparação de meios como *Plate Count Agar* (PCA) (VWR Chemicals, Belgium), *Potato Dextrose Agar* (PDA) (VWR Chemicals, Belgium), *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* (RBCA) (VWR Chemicals, Belgium) e *Reinforced Clostridial Agar* (RCA) (VWR Chemicals, Belgium) deve seguir as instruções que se encontram na embalagem do produto. A preparação dos meios foi realizada em frascos de vidro com capacidade de 500 mL, sendo que à quantidade proporcional de produto descrita na embalagem foram adicionados 500 mL de água destilada. No caso do *Buffered Peptone Water* (BPW) (Merck, Germany), este é preparado em frascos de vidro com capacidade de 100 mL e de 500 mL para a suspensão de amostras, dependendo do protocolo aplicado. Relativamente à preparação dos tubos de ensaio, foram medidos 9 mL do meio de suspensão *Maximum Recovery Diluent* (MRD) (Liofilchem, Italy). De seguida, o material acima descrito foi sujeito a esterilização, em autoclave, aplicando o binómio tempo-temperatura de 121 °C, 15 min.

3.2. Caracterização e monitorização da carga microbiana em matérias-primas consideradas críticas

O conhecimento dos microrganismos prevalentes nas matérias-primas utilizadas na FRULACT assume-se como uma das tarefas mais relevantes na avaliação do impacto de todas as etapas do processo produtivo e, de forma particular, na definição dos binómios tempo-temperatura do processo de pasteurização. De entre as matérias-primas utilizadas, destacam-se um leque de frutas frescas e congeladas, frutos secos, ervas aromáticas e cereais. A cada uma destas matérias-primas é associado um conjunto de fornecedores, cujos parâmetros microbiológicos, e consequentemente o nível de contaminação, varia. Aquando da receção de cada matéria-prima, de acordo com o fornecedor, é associado um código – designado por lote – que permite realizar a rastreabilidade da mesma. São os frutos vermelhos, nomeadamente framboesa e amora, e os cereais, como trigo e cevada, os que assumem especial interesse. Para além de serem

amplamente utilizados pela FRULACT, podem ter grande impacto na definição do binómio tempo-temperatura de pasteurização, dado a variabilidade da carga microbiana a si associada. Assim, na primeira etapa do presente trabalho foi realizada a caracterização das matérias-primas. Para que a amostragem fosse representativa, foram analisados entre três e cinco lotes de fornecedor, e diferentes tipos de ordem de transformação – corte e escolha. Com base nos resultados obtidos selecionaram-se os microrganismos-alvo, que devem ser controlados durante o processamento térmico, e que foram caracterizados nas tarefas subsequentes.

3.3. Recolha de amostras microbiológicas

As amostras a analisar foram retiradas aleatoriamente dos lotes disponíveis em fábrica. No caso dos cereais, depois de retirada a amostra esta foi colocada no frigorífico a 5 ± 2 °C, assim como no caso das frutas congeladas que eram submetidas a um processo de descongelação no frigorífico durante a noite (cerca de 16 h). Foram retirados 10 g de matéria-prima a analisar para um saco esterilizado do tipo *Stomacher*, acompanhado da adição de 90 mL de BPW, em duplicado, em condições de assepsia com o auxílio do bico de *Bunsen*. De seguida, homogeneizou-se as amostras colocando os sacos no *Stomacher (MagMixer® - 400P Interscience)* durante 90 s. De acordo com a carga microbiana inerente a cada tipologia de matéria-prima foi necessária a realização de diluições decimais, a fim de ser possível a quantificação dos diferentes tipos de microrganismos. Colocou-se o conteúdo homogeneizado em frascos de 100 mL, esterilizados, e deixou-se repousar durante 30 a 60 min.

Em paralelo, realizou-se o mesmo procedimento acima descrito, utilizando uma amostra de 50 g de matéria-prima em 450 mL de BPW.

3.4. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas envolveram duas fases: (1) quantificação de mesófilos totais, fungos filamentosos e leveduras de acordo com as normas ISO 4833-1:2013 e ISO 21527:2008, respetivamente; e (2) quantificação de bactérias formadoras de esporos, mesófilos aeróbios, mesófilos anaeróbios, termófilos aeróbios e termófilos anaeróbios, segundo método interno da FRULACT.

3.4.1. Quantificação de mesófilos totais

Na câmara de fluxo laminar (*Aura Mini, Bioair*), foi colocado 1 mL da suspensão inicial da amostra, com o auxílio da micropipeta volumétrica (VWR) na placa de Petri e adicionado PCA, pelo método de incorporação. Este procedimento foi realizado em duplicado. À semelhança da suspensão inicial, as diluições decimais seguiram o mesmo procedimento. De seguida, colocaram-se as placas semeadas a incubar na estufa a 30 ± 1 °C durante 72 ± 3 h.

3.4.2. Quantificação de fungos filamentosos e leveduras

Na câmara de fluxo laminar colocaram-se 100 µL da suspensão inicial em placas de Petri, previamente preparadas com RBCA, em duplicado. De seguida, pelo método de espalhamento, utilizando uma ansa de vidro e recorrendo ao bico de *Bunsen* – para manter as condições de assepsia – a amostra foi semeada na placa. De seguida, colocaram-se as placas preparadas a incubar na estufa a 25 ± 1 °C durante 5 dias.

3.4.3. Quantificação de bactérias formadoras de esporos

De modo a quantificar as bactérias formadoras de esporos, transferiram-se 40 mL da suspensão inicial – contida nos frascos de vidro de 500 mL – para tubos *Falcon* de 50 mL esterilizados. Este procedimento foi realizado na câmara de fluxo laminar. Os tubos *Falcon* foram sujeitos a banho térmico segundo o binómio tempo-temperatura de 80 °C, 10 min. De seguida, as amostras foram submetidas a um choque térmico através de um banho de água fria.

Posteriormente, colocou-se 1 mL da suspensão – presente no tubo *Falcon* – na placa de Petri e adicionou-se PCA e RCA, em duplicado, para a análise de bactérias aeróbias e anaeróbias, respetivamente. De acordo com a criticidade da matéria-prima, em alguns casos, foi necessário realizar uma segunda diluição, para análise de mesófilos e termófilos aeróbios.

De seguida procedeu-se à incubação das placas para a quantificação de bactérias mesófilas e termófilas. No caso do grupo mesófilo colocou-se as placas a 30 ± 1 °C durante 72 ± 3 h, em condições aeróbias e anaeróbias – para este último, com o auxílio das jarras de anaerobiose, utilizou-se geradores (*Anaerocult*), acompanhados da presença do indicador que garante a ausência de oxigénio. Em contrapartida, para o grupo termófilo as placas foram incubadas a 55 ± 1 °C durante 48 ± 3 h, igualmente em condições aeróbias e anaeróbias.

3.5. Esquematização do processo

3.5.1. Fase 1

Na figura 11 está representado o protocolo associado à fase que tem como objetivo a quantificação dos mesófilos totais, fungos filamentosos e leveduras.

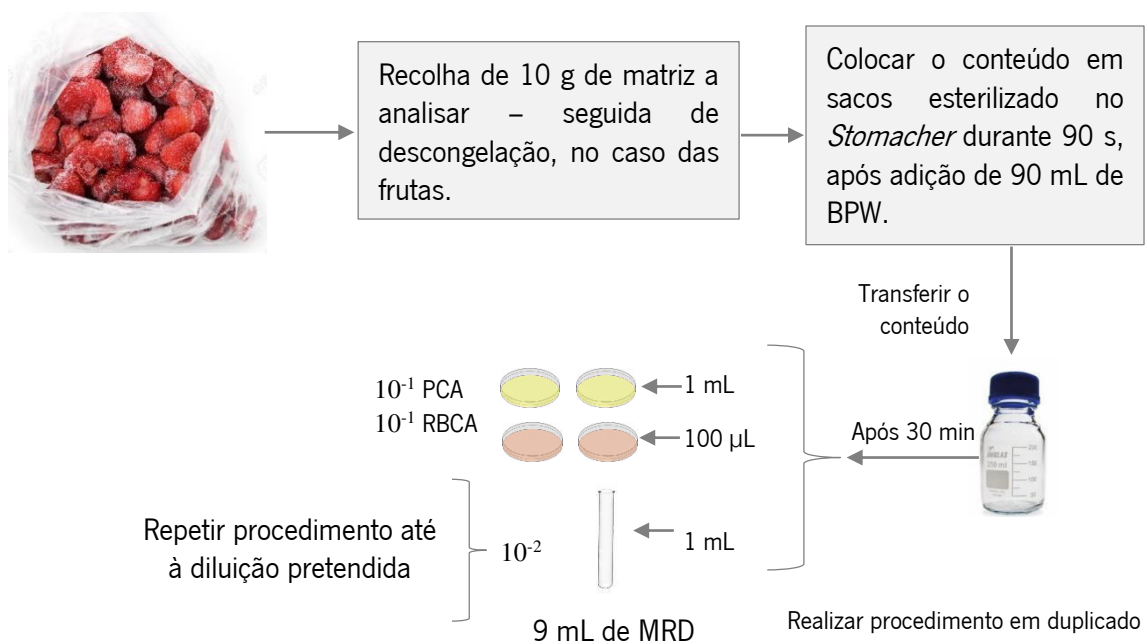


Figura 11 – Esquematização das análises microbiológicas para a quantificação de mesófilos totais, fungos filamentosos e leveduras.

3.5.2. Fase 2

Na figura 12 está representado o protocolo que corresponde à fase que tem como objetivo a quantificação de bactérias formadoras de esporos.

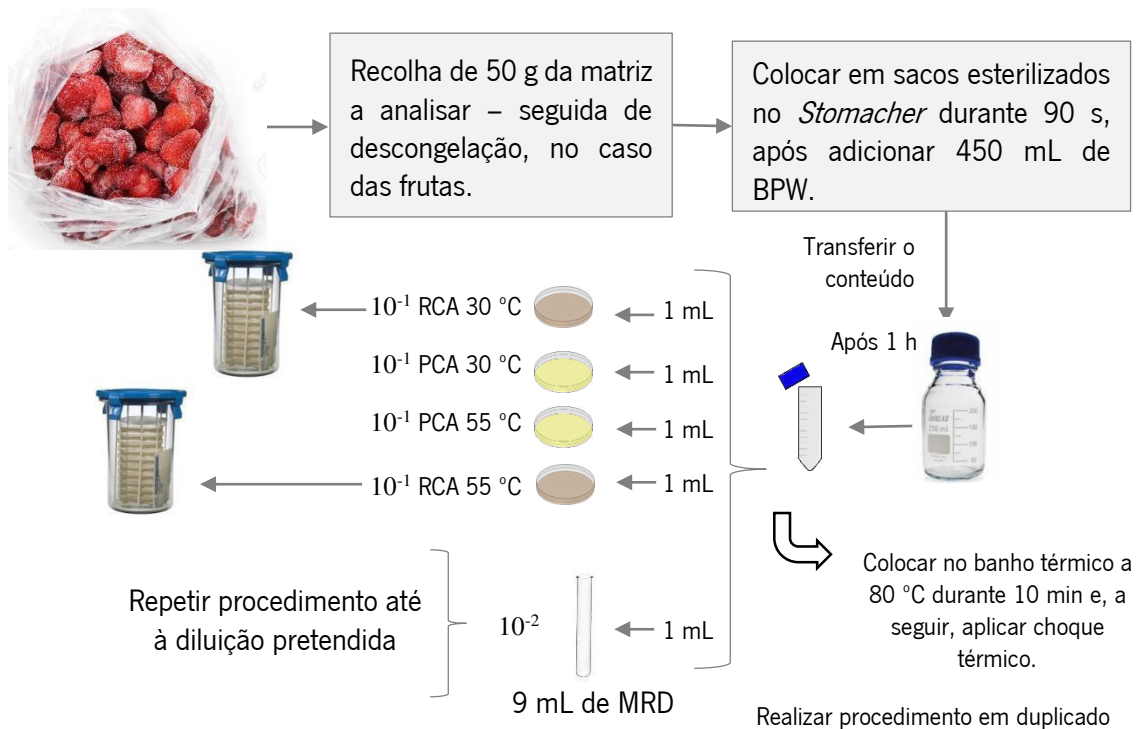


Figura 12 – Esquematização das análises microbiológicas para a quantificação de bactérias formadoras de esporos mesófilas e termófilas aeróbias e mesófilas e termófilas anaeróbias.

3.6. Avaliação do impacto de diferentes binómios tempo-temperatura de ingredientação

De forma a avaliar o impacto do binómio tempo-temperatura usado na etapa de ingredientação no desenvolvimento de carga microbiana dos preparados alvo, foi realizada uma simulação em pequena escala em laboratório usando as condições a que o preparado é submetido em fábrica. Os preparados escolhidos para ser submetidos a esta simulação foram: o preparado de amora e o preparado de framboesa – cada um com uma formulação de baixo °Brix e outra formulação de elevado °Brix – e um preparado de cereais com aveia, trigo e cevada. A escolha destes preparados baseou-se na sua (1) criticidade, (2) nas condições de pré-mix mais extremas, nomeadamente correspondente a tempos mais prolongados e (3) a_w alta e baixa. A simulação foi efetuada para 1 kg de preparado e os binómios tempo-temperatura de ingredientação foram aplicados com base no historial em fábrica de cada um dos preparados selecionados.

Para simular os binómios tempo-temperatura de ingredientação previamente selecionados recorreu-se a uma panela de aço inox – colocada sob uma placa de indução – e procedeu-se à elaboração do preparado segundo a sua formulação. Após atingida a temperatura requerida,

colocou-se a mistura num banho térmico de acordo com o tempo definido. Após o cumprimento do binómio tempo-temperatura selecionado, retiraram-se 200 g de preparado para se proceder à análise microbiológica, segundo o procedimento experimental descrito na secção 3.4.. Simultaneamente, os preparados de fruta formulados no laboratório foram monitorizados segundo os seus parâmetros físico-químicos, nomeadamente pH (potenciómetro, *Consort C860*), °Brix (refratómetro, *Bellingham+Stanley Ltd. RFM732*) e a_w (*Rotronic Hygrolab 3*).

3.7. Identificação e isolamento dos microrganismos-alvo capazes de resistir ao binómio tempo-temperatura aplicado na etapa de ingredientação

Com base na etapa de simulação de ingredientação, após realizadas as análises microbiológicas descritas no ponto 3.4., selecionaram-se os microrganismos que apresentavam as seguintes características: (1) repetibilidade entre lotes de fornecedor; (2) patogenicidade; (3) tipologia de carga microbiana, dando especial atenção às bactérias formadoras de esporos; e (4) microrganismos considerados termorresistentes e, por isso, capazes de resistir ao processamento térmico.

Assim, para o isolamento de fungos filamentosos repicou-se, em condições de assepsia, recorrendo ao bico de *Bunsen* e a uma ansa de metal, uma parte de cada microrganismo. De seguida, estes foram transferidos para placas de Petri, previamente semeadas com PDA. Por fim, as placas foram incubadas a 25 ± 1 °C durante 5 dias.

Relativamente às bactérias selecionadas para isolamento foram repicadas para placas previamente semeadas com PCA, aplicando a técnica por riscado. De seguida, as placas foram incubadas a 30 ± 1 °C, 72 ± 3 h ou 55 ± 1 °C, 48 ± 3 h conforme o seu comportamento mesófilo ou termófilo, respetivamente.

3.8. Estudo do comportamento dos microrganismos-alvo identificados, durante a aplicação de diferentes binómios tempo-temperatura de pasteurização

3.8.1. Inoculação dos preparados selecionados

Após selecionados os microrganismos considerados relevantes para este estudo, procedeu-se ao seu envio para um laboratório externo (BIOPREMIER, Lisboa), de forma a se proceder à sua

identificação por sequenciação genética. Conhecida a identificação dos microrganismos, foram selecionadas duas tipologias – um de natureza mesófila e um de natureza termófila – para assim se avaliar o comportamento destes microrganismos nos preparados alvo.

A etapa subsequente contemplou a preparação do inóculo. Nesse sentido, com o recurso a uma ansa esterilizada, em condições de assepsia, foram transferidas colónias – crescidas em placa, previamente armazenadas sob refrigeração – para frascos de vidro preparados com 1 L de BPW. De seguida, estes frascos foram colocados nas condições ótimas de crescimento dos microrganismos em análise, ou seja, incubados a 30 ± 1 °C, 72 ± 3 h ou incubados a 55 ± 1 °C, 48 ± 1 h. Decorrido o tempo de incubação, foram transferidos 5 % (v/v) da suspensão inicial, com auxílio de uma pipeta volumétrica esterilizada, para novos frascos de 1 L de BPW e incubados novamente sob as suas condições ótimas de crescimento.

Por fim, o conteúdo de cada frasco foi transferido, em condições de assepsia, para tubos *Falcon* esterilizados, sendo sujeitos a centrifugação (*Rotofix 32A*) durante 15 min a 4000 por minuto. O *pellet* obtido foi ressuscitado, numa quantidade residual de BPW, de modo a obter-se uma suspensão de células concentradas. As suspensões obtidas foram armazenadas na refrigeração a 5 ± 2 °C.

Os preparados estudados foram elaborados e, de seguida, pasteurizados segundo o binómio de tempo-temperatura de pasteurização de 100 °C durante 5 min sendo transferidos a quente para embalagens de plástico esterilizadas e armazenadas na refrigeração a 5 °C \pm 2 °C – de forma a evitar pós-contaminações capazes de interferir com as análises subsequentes, podendo conduzir a falsos positivos. O preparado a ser testado foi transferido, em condições de assepsia, para 7 tubos *Falcon* de 50 mL esterilizados, de modo a perfazer um volume de 40 mL em cada tubo. De seguida, foram inoculados com 5 % (m/m) da suspensão de células concentradas de cada microrganismo-alvo armazenado sob refrigeração. De seguida, os tubos *Falcon* foram agitados, com o auxílio do vórtex, e colocados no banho térmico segundo o binómio de tempo-temperatura de ingredientação que se pretendia simular.

3.8.2. Determinação dos parâmetros de cinética de inativação térmica (D_T e z)

Após o cumprimento do binómio tempo-temperatura de ingredientação, os tubos *Falcon* contendo o preparado em estudo foram colocados no banho térmico e submetidos ao binómio tempo-temperatura de pasteurização pretendido. Os binómios de tempo-temperatura de pasteurização aplicados neste estudo foram: 85 °C, 5 min; 90 °C, 4 min e 95 °C, 5 min – visto

que são os binómios de tempo-temperatura de pasteurização mais utilizados a nível interno. Foram monitorizados os tempos 1, 2, 3, 3,5, 4, 4,5 e 5 min, representados por cada tubo *Falcon*, sendo retirados do banho térmico, sequencialmente, conforme o intervalo de tempo que representavam.

De seguida, foram transferidos 10 g de cada tubo *Falcon*, em condições de assepsia, para frascos contendo 90 mL de BPW para, após 30 min, serem realizadas análises microbiológicas segundo o procedimento experimental descrito no subcapítulo 3.4. para a quantificação do microrganismo-alvo, em duplicado – para todos os intervalos de tempo anteriormente monitorizados.

3.9. Procedimentos estatísticos

Os valores apresentados nas tabelas e figuras que se seguem são resultados da média de diferentes leituras e encontram-se acompanhadas do seu desvio padrão. De modo a identificar diferenças significativas entre amostras e binómios de tempo-temperatura – tanto ao nível do processo de ingredientação, como ao nível da pasteurização – foi aplicado o teste *Anova* fator único com nível de significância de 0,05 e, em casos em que este teste apresentasse um $p < 0,05$, foi aplicado o teste T para duas amostras com variâncias iguais. No caso da elaboração de retas tendenciais foi calculado o R^2 associado. Toda a análise estatística foi realizada no programa *Microsoft Office Excel*, com o auxílio do suplemento: Análise de dados.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4.1. Caracterização e monitorização da carga microbiana em matérias-primas consideradas críticas

Inicialmente, de modo a caracterizar a carga microbiológica associada a cada uma das matérias-primas selecionadas procedeu-se à quantificação dos mesófilos totais, fungos filamentosos, leveduras e bactérias formadoras de esporos, entre elas mesófilas e termófilas, aeróbias e anaeróbias. De acordo com as diferentes tipologias de microrganismos avaliadas, são os fungos filamentosos e as bactérias formadoras de esporos que assumem especial interesse, na medida em que influenciam a escolha do binómio tempo-temperatura de pasteurização, para uma determinada matriz alimentar, dada a termorresistência inerente aos mesmos. Assim, o desafio passa por garantir a redução da carga microbiana para níveis legais aceitáveis – tendo sempre como principal objetivo garantir a segurança alimentar dos géneros alimentícios junto do consumidor (Pelczar *et al.*, 1996).

Na categoria das matrizes de fruta foram selecionadas algumas bagas, tal como a amora, a framboesa e o morango, visto serem matérias-primas amplamente utilizadas pela empresa. Aliada a este facto, a informação constante na ficha técnica inerente às matérias-primas em análise – ficha esta que contém todos os parâmetros controlados pelo fornecedor – e ao histórico de análises microbiológicas – salientando a elevada carga microbiana quantificada em bagas – tornam estas matrizes relevantes para este estudo.

A ordem de transformação a que a baga – neste caso, a amora – é submetida, representa um fator importante na medida em que este processo pode aumentar a perecibilidade dos alimentos e, desta forma, potenciar a presença de microrganismos, eventualmente patogénicos – devido ao manuseio e às lesões a que são submetidos (Tresseler *et al.*, 2009).

De forma semelhante, os cereais são matérias-primas às quais está associada um elevado grau de contaminação microbiológica. É de salientar que os dados internos e as fichas técnicas associadas a diferentes tipologias de cereais, mostram que estas matrizes são propensas ao desenvolvimento de carga bacteriana formadora de esporos – difícil de ser inativada pelo tratamento térmico, sendo por isso o seu controlo relevante para o presente estudo.

Para as matérias-primas analisadas – amora, framboesa, morango, farinha de aveia, farinha de cevada e farinha de trigo – encontram-se compilados em anexo (Anexo A: Tabela A1) os valores

médios das 4 leituras efetuadas para cada uma das análises descritas na secção 3.4. É de salientar que, atendendo ao limite de deteção técnica, quando se verifica uma concentração de lg de UFC/g inferior a 1, o valor não é tido em conta para o tratamento dos resultados.

4.1.1. Avaliação da carga microbiana após se proceder à ordem de transformação das matérias-primas selecionadas

De forma avaliar o impacto da ordem de transformação – nomeadamente de corte ou escolha – no desenvolvimento de carga microbiana, foram comparados diferentes lotes de matéria-prima antes e após sofrerem uma ordem de transformação. De entre as matérias-primas selecionadas para o presente estudo, escolheu-se a amora uma vez que é utilizada em diferentes formas nos preparados FRULACT. Assim sendo, de entre os três lotes de amora selecionados para a quantificação microbiana, antes e após serem submetidos a escolha, procedeu-se à análise de mesófilos totais, fungos filamentosos e bactérias formadoras de esporos.

As amostras analisadas provêm do mesmo lote de matéria-prima pelo que não é possível comparar a variabilidade da carga microbiana associada entre diferentes lotes. No entanto, foi possível testar a carga microbiana associada aos processos de transformação da amora.

Os resultados microbiológicos, mostram o aumento da carga microbiana (figura 13). No entanto, tendo em conta o teste estatístico *Anova* (Anexo A: Tabela A2) constata-se que não existem diferenças significativas entre as três amostras analisadas. Na verdade, as amoras possuem uma epiderme bastante fina, quando comparada com outras bagas – e.g. o mirtilo – tendo como principal consequência o facto deste fruto ser mais suscetível e vulnerável a danos e ruturas. Para além disso, a amora apresenta uma textura muito característica com inúmeras protuberâncias, facilitando a sua deterioração pela ação microbiana. De acordo com Pinotti *et al.* (2011), a amora é um fruto que contém na sua flora microbiana fungos filamentosos como os géneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Clonostachys* sp. e *Trichoderma* sp.

A carga microbiana aumenta após a amora ser submetida ao processo de escolha, nomeadamente em termos de leveduras, como seria de esperar. Este aumento poderá estar relacionado com o processo de transformação por si só, visto que o manuseamento da amora eventualmente permitirá a exposição das suas estruturas, sendo facilmente sujeitas ao risco de contaminações cruzadas – tanto ao nível da carga associada ao ambiente, como à manipulação. Assim, (1) o controlo da temperatura, aquando da escolha; (2) o cumprimento das boas práticas

de higiene; e (3) o correto acondicionamento das matrizes, nomeadamente recorrendo à sua congelação, são fatores que são levados em conta pela FRULACT – por forma a evitar o desenvolvimento microbiano. É de referir que não foram quantificadas bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias e apenas se registou a presença de bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias na amora antes do processo de escolha.

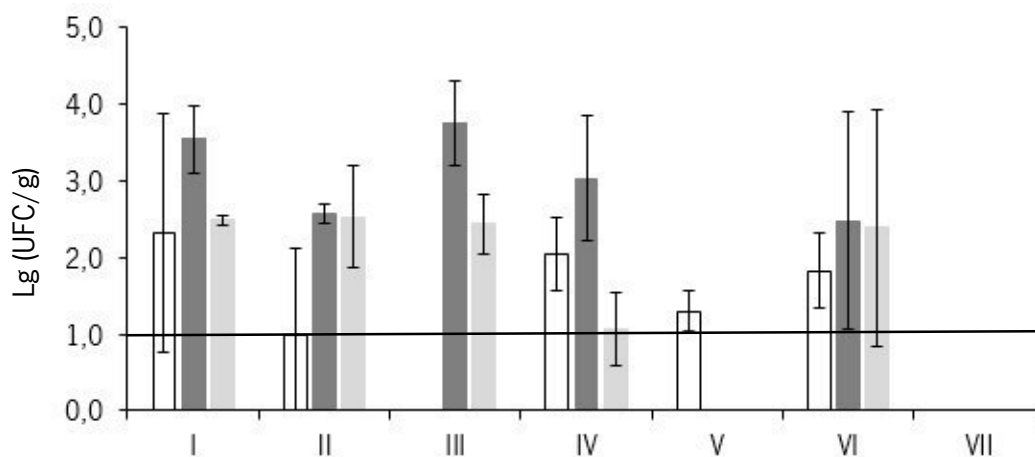


Figura 13 – Carga microbiana associada à amora (□), amora escolhida A (■) e amora escolhida B (▒) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão com limite de deteção de lg (UFC/g) \geq 1.

4.1.2. Avaliação da variabilidade da carga microbiana associada a diferentes lotes de matérias-primas

4.1.2.1. Framboesa

De entre os cinco lotes de framboesa analisados é possível verificar que a carga microbiana associada aos mesmos é distinta, revelando a sua elevada variabilidade (figura 14). Estatisticamente, é possível afirmar, após a realização do teste *Anova* (Anexo A: Tabela A3), que as amostras de framboesa apresentam diferenças significativas em termos de leveduras (amostras B-C e B-E), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (amostras A-E, B-E, C-D, C-E e D-

E), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (amostras B-C e C-E) e bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (amostras D-E).

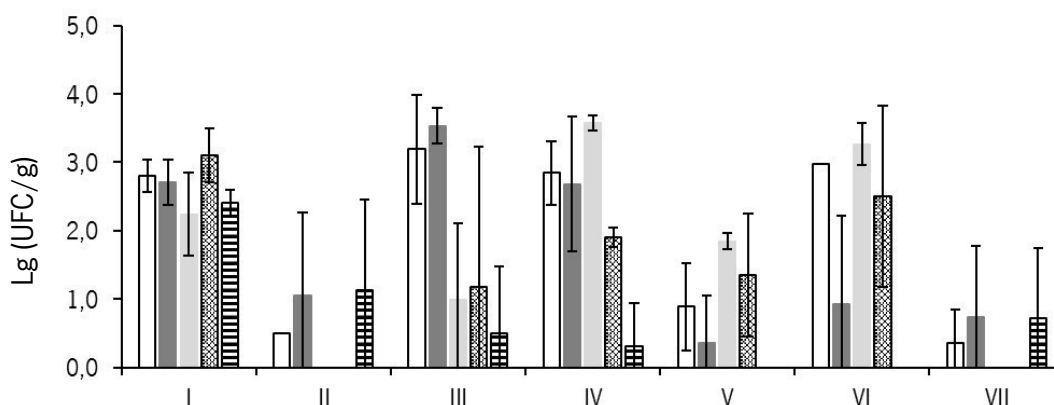


Figura 14 – Carga microbiana associada à framboesa A (□), framboesa B (■), framboesa C (▒), framboesa D (▣) e framboesa E (▤) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão com limite de detecção de \lg (UFC/g) ≥ 1 .

A variabilidade associada aos diferentes lotes analisados poderá estar associada a diferentes fatores, tal como: (1) sazonalidade, i.e. o mês contemplado na colheita do fruto; e (2) contacto com o solo, uma vez que parâmetros como a humidade do solo - como relatado por Moura *et al.*, 2015, Amarante *et al.* (2010) e Rodrigues *et al.* (2011) – podem influenciar o desenvolvimento microbiano. É de destacar que a framboesa apresenta uma elevada carga bacteriana formadora de esporos mesófila anaeróbia que poderá constituir um risco em condições que potenciem o seu desenvolvimento, nomeadamente na ausência de oxigénio e na presença de azoto.

Note-se que apesar de se apresentar os valores de carga microbiológica associados à análise da framboesa, considera-se que valores de inferiores \lg (UFC/g) a 1 se encontram abaixo do limite de deteção da técnica. No presente estudo, estes dados são igualmente importantes para a FRULACT, na medida em que todas as contagens devem ser consideradas para a determinação da quantificação microbiana – de forma a obedecer aos limites microbiológicos impostos para a expedição do produto final. Assim, também é possível prever a eficiência do processo de pasteurização.

4.1.2.2. Morango

Através das análises microbiológicas realizadas ao morango (figura 15), foi possível constatar que nenhuma das amostras analisadas apresenta carga de leveduras, ao contrário do que seria de esperar – visto tratar-se de um fruto que se encontra tipicamente em contacto com o solo. Ainda assim, o facto do morango estar previamente congelado, poderá alterar a carga fúngica a ele inerente, nomeadamente de leveduras – levando à sua inativação, durante o período em que a matriz se encontra congelada (Adams e Moss, 2000). Note-se que foram considerados valores de lg inferiores a 1 – abaixo do limite de deteção da técnica. As amostras de morango não apresentam diferenças estatisticamente significativas relevantes (Anexo A: Tabela A4).

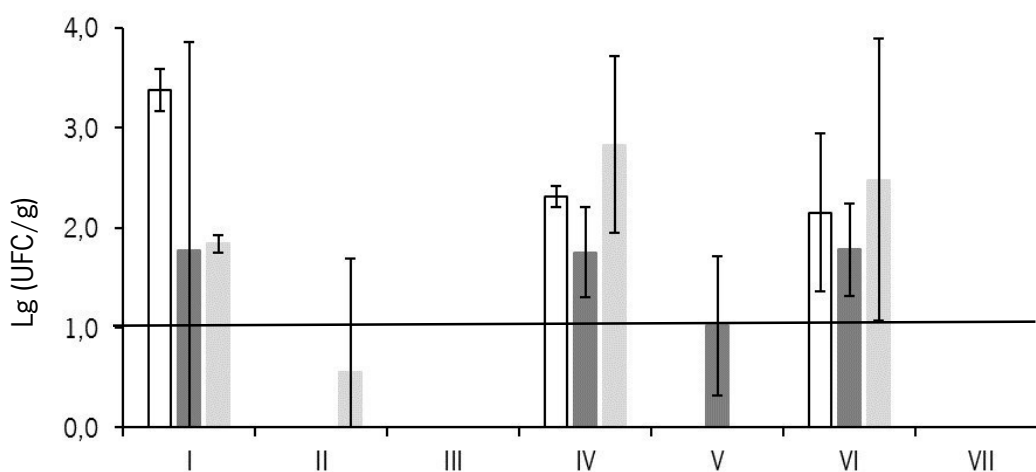


Figura 15 – Carga microbiana associada ao morango A (□), morango B (■) e morango C (▒) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão com limite de deteção de lg (UFC/g) \geq 1.

De acordo com o estudo de Jensen *et al.* (2013), a quantificação de mesófilos totais presentes no morango está de acordo com os apresentados no estudo, sendo que são esperadas concentrações na ordem de 10^4 UFC/g. Os principais géneros de bactérias encontrados no morango, segundo este estudo, são o *Curtobacterium* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Rahnella* sp. A presença de fungos filamentosos e leveduras, embora em menor quantidade, como referido anteriormente, deveria ser quantificável (Jensen *et al.*, 2013; Saddozai *et al.*, 2012).

4.1.2.3. Farinha de trigo

Na figura 16 encontra-se representado o comportamento da carga microbiana associada a farinha de trigo sênea fina e à farinha de trigo sênea grossa. Através da análise da figura é possível constatar que a tipologia de sênea grossa apresenta uma maior contaminação microbiana quando comparada com a sênea fina. No entanto, atendendo a que apenas foi possível analisar um lote de farinha de trigo de sênea fina não é possível avaliar o impacto sobre a variabilidade da matriz entre diferentes lotes. Note-se que foram tidos em conta valores de lg inferiores a 1 – abaixo do limite de deteção da técnica.

De acordo com a figura 16 verifica-se o aumento da carga associada a fungos filamentosos e leveduras, quando comparado com as frutas anteriormente analisadas. No entanto, salienta-se que as amostras de farinha de trigo sênea grossa apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si, como demonstrado pelo teste da *Anova* na tabela A5, anexo A.

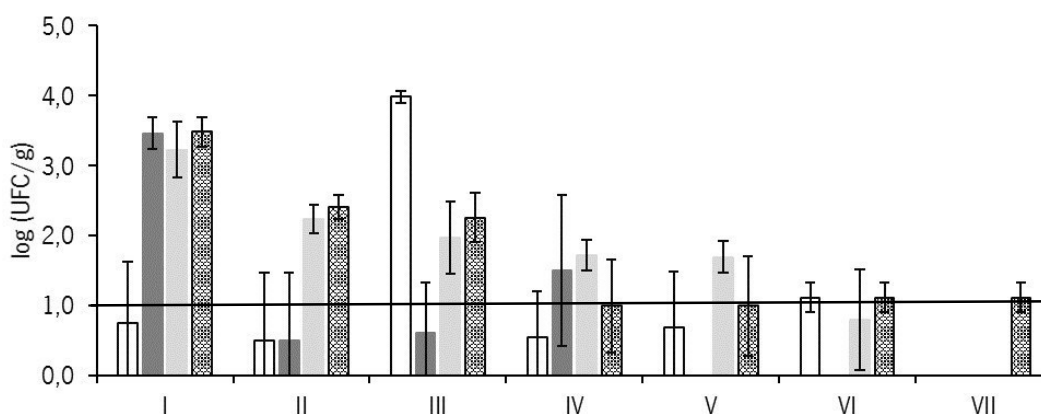


Figura 16 – Carga microbiana associada à farinha de trigo sênea fina (□), farinha de trigo sênea grossa A (■), farinha de trigo sênea grossa B (▒) e farinha de trigo sênea grossa C (▨) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão com limite de deteção $\lg(\text{UFC/g}) \geq 1$.

A qualidade microbiológica da farinha de trigo está maioritariamente relacionada com a qualidade do grão. Estudos científicos apresentam uma concentração $\lg(\text{UFC/g})$ na ordem dos 3,7 de fungos filamentosos na farinha de trigo (Seiler, 1986), valores estes que se apresentam de acordo com os resultados obtidos para a farinha de trigo de sênea grossa – amostras B e C. No entanto, visto que como já descrito, a qualidade microbiológica da farinha de trigo está relacionada

com a qualidade microbiológica do grão, diferentes amostras, provenientes de diferentes grãos de trigo, podem apresentar variabilidade microbiológica entre si. O estudo de Richter *et al.* (1993) apresenta a média de diferentes amostras de farinha de trigo em termos de leveduras e de fungos filamentosos mostrando médias de lg (UFC/g) de 2,1 e de 2,9, respetivamente. Outros estudos elaborados por Aydin *et al.* (2009), Berghofer *et al.* (2003), Eglezos (2010), Manthey *et al.* (2004), Sperber *et al.* (2007) e Weidenbörner *et al.* (2010) apresentam valores semelhantes aos obtidos laboratorialmente no decorrer deste projeto para microrganismos em termos de fungos filamentosos e leveduras. A presença de fungos filamentosos em quantidades significativas nos cereais encontra-se de acordo com o esperado, uma vez que os cereais apresentam valores de a_w baixos e como tal, aumenta a resistência dos fungos filamentosos a condições de *stress* (Almeida *et al.*, 2013).

Relativamente à quantificação dos microrganismos formadores de esporos aeróbios estes encontram-se dentro das gamas de lg (UFC/g) entre 1,0 e 7,0 para mesófilos aeróbios e entre 1,0 e 2,0 para termófilos aeróbios descritas na literatura (Berghofer *et al.*, 2003). Segundo estudos conduzidos por Berghofer *et al.*, 93 % das 81 amostras de farinha de trigo analisadas relevaram a presença de *B. cereus*, um microrganismo formador de esporos patogénico, como abordado no subcapítulo 2.4.. É de salientar que esta espécie se apresenta como um microrganismo-alvo, na definição do binómio tempo-temperatura de pasteurização.

4.1.2.4. Farinha de aveia e farinha de cevada

De seguida, foram analisadas amostras de farinha de aveia e de farinha de cevada tendo sido possível observar a elevada carga microbiana associada às duas tipologias de farinha, nomeadamente em termos de mesófilos totais e leveduras (figura 17). No entanto, quando analisadas em separado, verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre diferentes lotes de farinha de cevada, exceto em termos de mesófilos totais e de bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (Anexo A: Tabela A6).

Em matérias-primas como os cereais existe propensão para o desenvolvimento de bactérias como o *B. cereus* pertencentes à categoria dos microrganismos formadores de esporos mesófilos aeróbios. Destaca-se que a presença desta espécie nas matérias-primas representa um risco para o tratamento térmico, devido à termorresistência que lhe está associada, como já foi mencionado anteriormente.

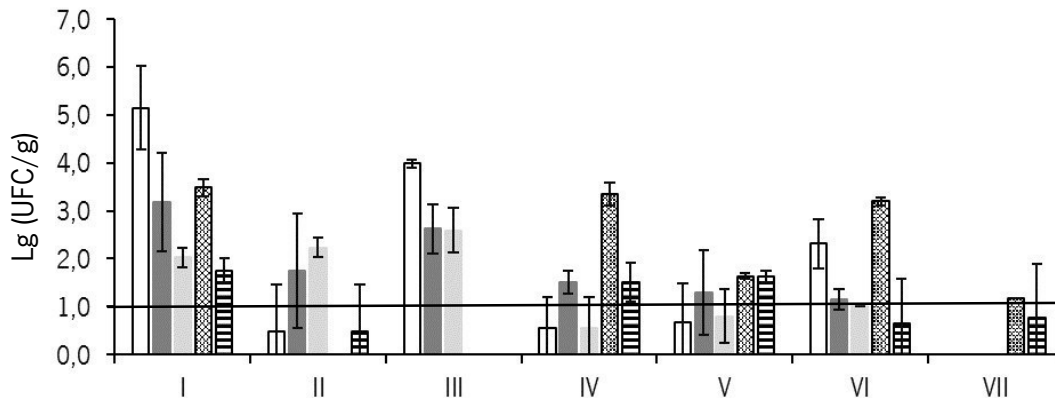


Figura 17 – Carga microbiana associada à farinha de cevada A (□), farinha de cevada B (■), farinha de cevada C (▒), farinha de aveia A (▣) e farinha de aveia B (▤) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão com limite de detecção de \lg (UFC/g) \geq 1.

4.2. Avaliação do impacto de diferentes binómios tempo-temperatura de ingredientação, no comportamento da carga microbiana presente em matrizes FRULACT

De modo a avaliar o impacto que a etapa de ingredientação possui sobre o desenvolvimento da carga microbiana presente nas matérias-primas, foram realizados ensaios laboratoriais, utilizando preparados previamente selecionados segundo as características descritas (subcapítulo 3.6.). Os preparados foram submetidos a binómios de tempo-temperatura de ingredientação, segundo as condições reais aplicadas na unidade fabril. Assim, a avaliação da carga microbiana capaz de sobreviver às condições: (1) binómio tempo-temperatura; (2) composição da matriz; e (3) presença de pedaços, avaliando a resistência microbiana no seu centro térmico – decorrentes da presente etapa do processo produtivo – permitirá identificar e isolar os microrganismos passíveis de sobreviverem às condições do processamento térmico.

4.2.1. Preparado de amora

Para o preparado de amora foram avaliadas duas condicionantes: o impacto do binómio de tempo-temperatura, bem como a variação da a_w – na sobrevivência de diferentes tipologias de microrganismos. Nesta etapa foi apenas realizado um ensaio para cada binómio tempo-temperatura de ingredientação, seguido da aplicação das análises descritas na secção 3.4.

Tendo por base a avaliação da sobrevivência microbiana face à exposição de diferentes valores de a_w , foram analisadas duas referências distintas, para a mesma tipologia de fruto. No caso da amora, selecionou-se uma referência com elevada a_w – traduzida pelo seu baixo °Brix – e outra com baixa a_w – traduzida pelo elevado °Brix. As duas referências foram expostas a cinco binómios de tempo-temperatura de ingredientação diferentes: 2 h, 35 °C; 3 h, 35 °C; 3 h, 50 °C; 4 h, 35 °C e 4 h, 50 °C. De acordo com o gráfico da figura 18 referente ao preparado de amora de baixo °Brix, é possível concluir que a carga microbiana reduz abruptamente, quando comparada com a carga associada ao respetivo lote de matéria-prima utilizado na elaboração dos preparados.

De forma a facilitar a análise dos resultados obtidos, e atendendo que os valores de lg (UFC/g) inferiores a 1 se encontram abaixo do limite de deteção da técnica, optou-se por não os considerar. No entanto, todos os valores referentes à carga microbiológica, associada às matrizes analisadas, foram contabilizados e registados.

Relativamente aos mesófilos totais, é possível verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas (Anexo B, tabela B1) de entre os vários binómios tempo-temperatura aplicados. Na verdade, apesar destes microrganismos possuírem uma gama de temperaturas na ordem de 30 °C – 45 °C para o seu desenvolvimento ser assegurado, mesmo quando expostos a temperaturas de 50 °C estes não são inativados – visto que apresentam uma vasta tolerância à temperatura (Adams e Moss, 2000).

De acordo com a figura 18 é possível verificar que os binómios de tempo-temperatura aplicados se revelam suficientes para a redução da carga microbiana, nomeadamente fungos filamentosos, leveduras e bactérias formadoras de esporos para níveis aceitáveis, de acordo com as especificações FRULACT. No entanto, foi registada carga microbiana significativa em termos de microrganismos formadores de esporos mesófilos aeróbios – associada aos binómios de tempo-temperatura de 2 h, 35 °C e de 4 h, 35 °C – e, ao contrário do que seria de esperar, não foi registado um comportamento microbiano semelhante para o binómio tempo-temperatura intermédio (3 h, 35 °C). A sobrevivência de carga esporulada anteriormente referida – nas condições apresentadas – está de acordo com o esperado, visto que 35 °C é considerada uma

temperatura que favorece o seu crescimento. Mais ainda, a manutenção dos microrganismos em condições favoráveis ao seu crescimento, por longos períodos de tempo (4 h), poderá permitir estimular a termorresistência que lhes está associada – tal como observado.

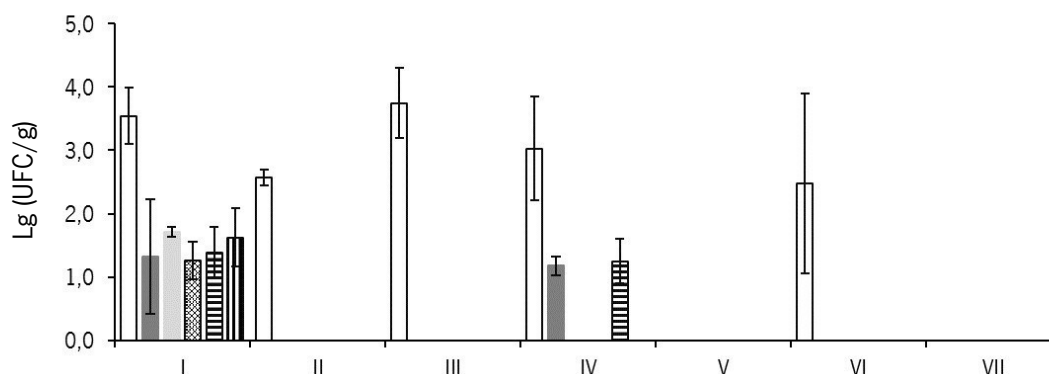


Figura 18 – Comparação do efeito do binómio tempo-temperatura de ingredientação na carga microbiana do preparado de amora (baixo °Brix). Carga microbiana associada à matéria-prima (□), ao binómio de tempo-temperatura de ingredientação 2 h, 35 °C (■), 3 h, 35 °C (■), 3 h, 50 °C (▣), 4 h, 35 °C (▤) e 4 h, 50 °C (▥) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras ± desvio padrão.

De seguida, foram testados os mesmos binómios de tempo-temperatura para o preparado de amora com elevado °Brix. De acordo com a literatura, o aumento do °Brix – proporcionado por certos açúcares como o sorbitol, a sacarose e a glicose – aumenta a termorresistência dos microrganismos (Adams e Moss, 2000).

Tal como no caso do preparado de amora de baixo °Brix, particularmente para os mesófilos totais, não se registam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes binómios tempo-temperatura aplicados (Anexo B: Tabela B1). Ainda assim, é possível verificar diferenças estatisticamente significativas quando comparada a carga microbiana associada à matéria-prima com o preparado submetido a diferentes binómios de tempo-temperatura de ingredientação (figura 19).

De acordo com Slongo *et al.* (2005) seria de esperar um aumento da termorresistência microbiana com o aumento do °Brix. No entanto, na análise microbiológica deste preparado, não foi possível verificar o impacto da presença de condições distintas de °Brix. Ainda assim, foi

possível observar que para o binómio tempo-temperatura de 4 h, 50 °C existiu um ligeiro aumento da carga formadora de esporos mesófila aeróbia, denotando um ligeiro aumento da termorresistência, face à exposição a condições de *stress* – nomeadamente o aumento da temperatura.

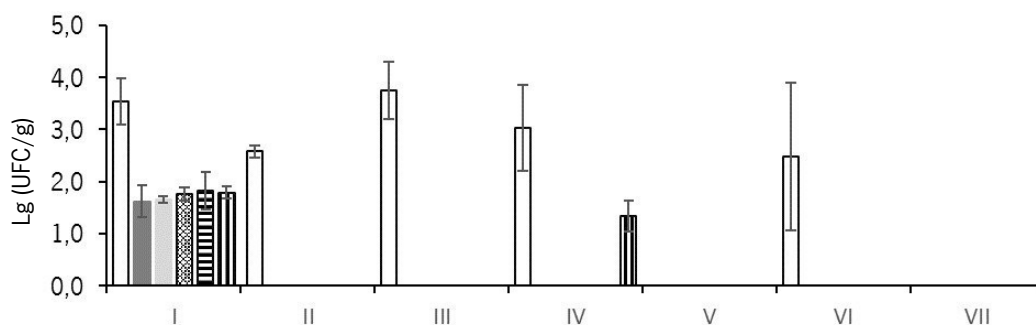


Figura 19 – Comparação do efeito do binómio de tempo-temperatura de ingredientação na carga microbiana do preparado de amora (elevado °Brix). Carga microbiana associada à matéria-prima (□), ao binómio tempo-temperatura de ingredientação 2 h, 35 °C (■), 3 h, 35 °C (▒), 3 h, 50 °C (▣), 4 h, 35 °C (▤) e 4 h, 50 °C (▥) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras ± desvio padrão.

Os valores médios das 4 leituras efetuadas encontram-se compilados nas tabelas B2 e B3 (Anexo B), resultantes das análises microbiológicas aplicadas aos preparados de amora de baixo °Brix e de elevado °Brix.

De modo a avaliar o impacto das propriedades físico-químicas dos preparados de amora, foram registados os valores de °Brix, pH e temperaturas mínimas e máximas observadas durante a aplicação do binómio tempo-temperatura de ingredientação (tabela 11).

Comparando os dois preparados, anteriormente analisados, verifica-se que os mesófilos totais são os únicos microrganismos onde se observa um crescimento significativo. Apesar de ambos os preparados de amora apresentarem uma gama bastante alargada de sobrevivência de mesófilos totais, estes não são considerados resistentes a temperaturas de pasteurização, pelo que o processamento térmico facilmente permite a sua inativação.

Tabela 11 – Compilação dos parâmetros de °Brix (valor médio de 3 amostras $\pm 0,1$), pH (valor médio de 3 amostras $\pm 0,01$) e temperaturas mínima e máxima dos preparados de amora para diferentes binómios de tempo-temperatura de ingredientação

	Binómio de tempo-temperatura	° Brix	pH	Tmin (°C)	Tmáx (°C)
Preparado de Amora (baixo °Brix)	2 h, 35 °C	8,1	3,45	35,7	40,8
	3 h, 35 °C	8,0	3,50	35,7	40,8
	3 h, 50 °C	7,9	3,47	48,9	52,5
	4 h, 35 °C	7,9	3,50	35,7	40,8
	4 h, 50 °C	7,8	3,48	48,9	52,5
Preparado de Amora (elevado °Brix)	2 h, 35 °C	21,4	3,75	34,2	38,5
	3 h, 35 °C	22,9	3,80	34,2	38,5
	3 h, 50 °C	22,8	3,72	48,5	54,2
	4 h, 35 °C	23,4	3,75	34,2	38,5
	4 h, 50 °C	23,3	3,73	48,5	54,2

4.2.2. Preparado de framboesa

Na categoria dos preparados de fruta, foram ainda testados de forma semelhante aos preparados de amora, dois preparados de framboesa – selecionados de acordo com periodicidade inerente à sua produção. De forma a comparar o impacto da presença de açúcar, na sobrevivência microbiana, os preparados de framboesa em análise foram formulados obedecendo a um valor de °Brix de 8 ± 2 e de 50 ± 2 , valores estes correspondentes a um baixo e elevado °Brix, respetivamente.

Para o preparado de framboesa de baixo °Brix onde foram testados quatro binómios tempo-temperatura de ingredientação – 2 h, 35 °C; 3 h, 50 °C, 3h, 40 °C e 6 h, 40 °C – tendo sido verificadas diferenças estatisticamente significativas entre o binómio tempo-temperatura de 2 h, 35 °C quando comparado com os restantes binómios analisados (Anexo B: tabela B4; figura 20). Tal encontra-se de acordo com o esperado visto que 35 °C se encontra dentro da gama de temperaturas ótimas para o desenvolvimento de leveduras. Relativamente ao comportamento microbiano presente na matéria-prima verificaram-se igualmente diferenças estatisticamente

significativas entre esta e os diferentes binómios tempo-temperatura aplicados, observando-se uma diminuição significativa da quantificação de carga microbiana.

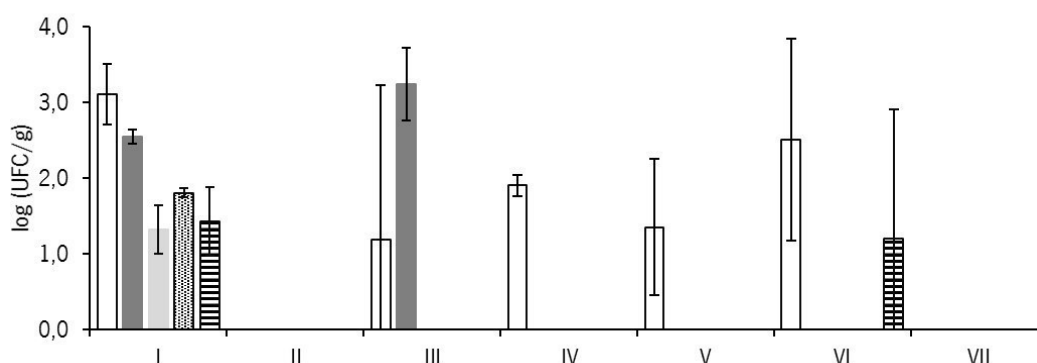


Figura 20 – Comparação do efeito do binómio de tempo-temperatura de ingredientação na carga microbiana do preparado de framboesa (baixo °Brix). Carga microbiana associada à matéria-prima (□), ao binómio tempo-temperatura de ingredientação 2 h, 35 °C (■), 3 h, 50 °C (▒), 3 h, 40 °C (▤) e 6 h, 40 °C (▥) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão.

Para o preparado de framboesa de °Brix de $50,7 \pm 0,5$ foram testados quatro binómios tempo-temperatura de ingredientação – 2 h, 35 °C; 1 h, 40 °C, 3h, 50 °C e 1 h, 60 °C. Através dos dados obtidos de carga microbiana associada ao preparado de framboesa de elevado °Brix é possível verificar a tendência das amostras analisadas até ao momento, isto é a diminuição da carga microbiana do preparado depois da aplicação de um binómio tempo-temperatura de ingredientação (figura 21).

Visto que este preparado de framboesa apresenta elevado °Brix é de esperar um aumento na termorresistência associada aos microrganismos (Slongo *et al.*, 2005). No presente estudo verificou-se efetivamente o aumento da termorresistência associada, particularmente a bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias para os binómios tempo-temperatura de ingredientação de 2 h, 35 °C e 1 h, 60 °C. Assim, possivelmente a presença de condições de elevadas concentrações de açúcar na matriz promove a esporulação das células vegetativas – visto estas serem sujeitas a uma condição de *stress* – permitindo que as bactérias se mantenham protegidas. Face aos resultados obtidos, observa-se que estas possuem a capacidade de se manterem viáveis durante períodos de tempo prolongados – e.g. 2 h – ou a temperaturas que não sejam

consideradas toleráveis para que ocorra o seu desenvolvimento, enquanto células vegetativas – e.g. 60 °C.

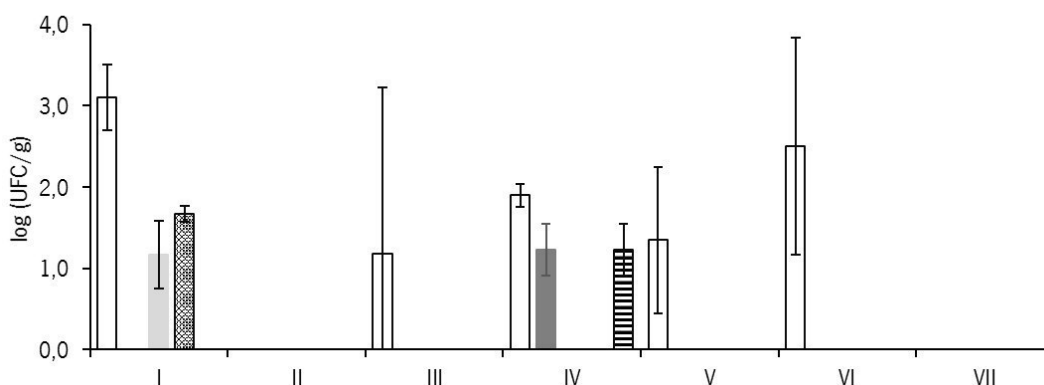


Figura 21 – Comparação do efeito do binómio de tempo-temperatura de ingredientação na carga microbiana do preparado de framboesa (elevado °Brix). Carga microbiana associada à matéria-prima (□), ao binómio tempo-temperatura de ingredientação 2 h, 35 °C (■), 1 h, 40 °C (▒), 3 h, 50 °C (▣) e 1 h, 60 °C (▤) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão.

É de salientar que o comportamento dos microrganismos pertencentes à categoria dos mesófilos totais ou de leveduras é potenciado no preparado de framboesa com °Brix de $7,9 \pm 0,3$. Este comportamento poderá ser baseado no facto de grande parte dos mesófilos totais e das leveduras não resistirem a concentrações de açúcares elevadas e não possuírem mecanismos – como a esporulação – para se manterem viáveis em condições de *stress* microbiano, sendo que desta forma o seu desenvolvimento é impossibilitado tal como se pode constatar pela análise das figuras 20 e 21. No entanto, existem algumas leveduras – classificadas como osmofílicas – capazes de se desenvolverem em ambientes de alta pressão osmótica, tolerar elevadas concentrações de açúcar e por conseguinte baixa a_w (Pezente, 2011). Os resultados das quatro leituras realizadas encontram-se compilados nas tabelas B5 e B6 do anexo B.

De modo a avaliar o impacto das propriedades físico-químicas dos preparados de framboesa, foram registados os valores de °Brix, pH e temperaturas mínimas e máximas observadas durante a aplicação do binómio tempo-temperatura de ingredientação (tabela 12).

Tabela 12 – Compilação dos parâmetros de °Brix (valor médio de 3 amostras \pm 0,1), pH (valor médio de 3 amostras \pm 0,01) e temperaturas mínima e máxima dos preparados de framboesa para diferentes binómios de tempo-temperatura de ingredientação

	Binómio de tempo-temperatura	° Brix	pH	Tmin (°C)	Tmáx (°C)
Preparado de Framboesa (baixo °Brix)	2 h, 35 °C	7,5	3,45	34,1	41,2
	3 h, 40 °C	7,9	3,41	37,3	42,5
	3 h, 50 °C	7,7	3,63	50,2	50,4
	6 h, 40 °C	8,3	4,50	37,3	42,5
Preparado de Framboesa (elevado °Brix)	1 h, 40 °C	50,7	3,79	39,6	42,8
	1 h, 60 °C	51,3	3,85	58,7	62,7
	2 h, 35 °C	50,0	3,70	33,4	38,7
	3 h, 50 °C	50,6	3,82	48,7	53,9

4.2.3. Preparado de cereais

Após o estudo do impacto do binómio tempo-temperatura de ingredientação nos preparados de fruta (subcapítulos 4.2.1. e 4.2.2.) procedeu-se à avaliação no preparado de cereais. O preparado de cereais foi selecionado com base: (1) na percentagem de incorporação das matérias-primas consideradas críticas (descritas individualmente na secção 4.1.1.2.); (2) na tipologia de microrganismos deteriorantes, e patogénicos, capazes de constituírem um risco na elaboração dos respetivos preparados; e (3) nas condições de pH e °Brix praticadas. À semelhança dos preparados de fruta, foram também selecionados para o presente estudo binómios tempo-temperatura de ingredientação aplicados na unidade fabril – 1 h, 20 °C; 3 h, 20 °C; 2 h, 40 °C e 3 h, 40 °C. Assim, de acordo com o estudo do impacto do desenvolvimento microbiano, as condições de ingredientação podem ser facilmente ajustadas ao nível industrial.

Atendendo tratar-se de um preparado com múltiplos cereais, a carga microbiana foi quantificada com base no cálculo das diferentes percentagens de cada cereal, presentes no mesmo. Isto significa que, conhecendo a carga microbiana de cada cereal individualmente, e multiplicando a mesma pela percentagem de incorporação no preparado, é possível estimar a carga microbiana inicial do conjunto das matérias-primas utilizadas.

Pela análise da figura 22 conclui-se que esta tipologia de matérias-primas apresenta uma elevada quantificação de carga microbológica, essencialmente em termos de mesófilos totais (lg (UFC/g) na ordem dos 3) e leveduras (lg (UFC/g) na ordem dos 2). Relativamente aos binómios tempo-temperatura de ingredientação, é na comparação da quantificação de mesófilos totais e fungos que se observam diferenças estatisticamente significativas (Anexo B: tabela B7). De acordo com a caracterização microbiológica associada aos cereais (subcapítulo 2.2.), foi possível denotar que estas matrizes são particularmente propensas ao desenvolvimento de leveduras. Assim, caso sejam verificadas condições favoráveis ao seu desenvolvimento, durante a ingredientação, estas irão multiplicar-se exponencialmente. De acordo com o pH de $4,19 \pm 0,04$ e com a a_w , inerente ao preparado de cereais, o tempo de exposição às condições de ingredientação parecem também influenciar a quantificação microbiana. Neste contexto, observam-se diferenças estatisticamente significativas entre os binómios tempo-temperatura de ingredientação de 1 h, 20 °C e 3 h, 40 °C, no que respeita à quantificação de mesófilos totais e fungos.

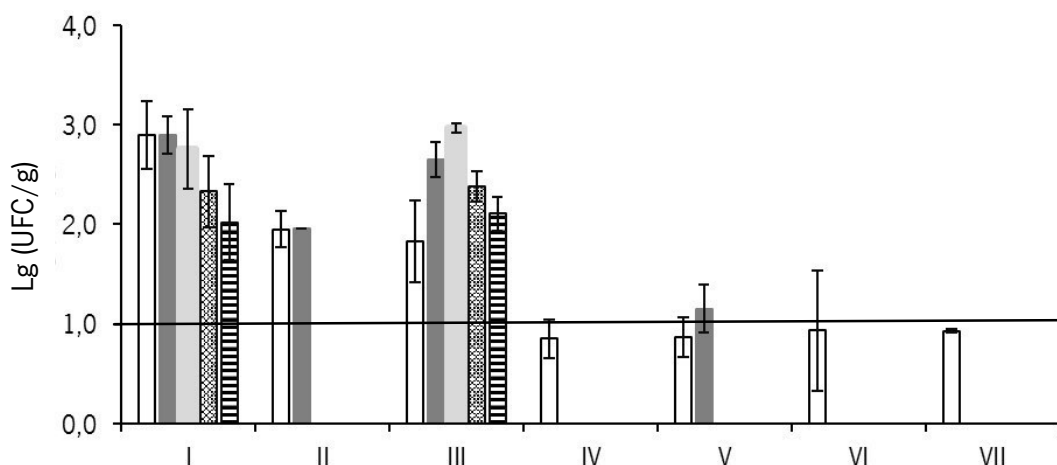


Figura 22 – Comparação do efeito do binómio de tempo-temperatura de ingredientação na carga microbiana do preparado de cereais. Carga microbiana associada à matéria-prima (□), ao binómio tempo-temperatura de ingredientação 1 h, 20 °C (■), 3 h, 20 °C (■), 2 h, 40 °C (▨) e 3 h, 40 °C (▨) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão com limite de deteção de $\lg(\text{UFC/g}) \geq 1$.

Tendo por base que a gama de temperaturas ótimas de crescimento destes microrganismos se situa entre 30 °C e 45 °C (Adams e Moss, 2000), é no tempo de permanência em *pré-mix* que se verifica o impacto ao nível do crescimento microbiano. No entanto, de acordo com a figura 22,

observa-se crescimento microbiano quando submetidos a uma temperatura de 20 °C, mostrando assim a sua capacidade de adaptação a temperaturas fora da sua gama ótima de crescimento. Por outro lado, eventualmente, a condição de tempo prolongado sob uma determinada temperatura (20 – 40 °C) parece constituir uma condição de *stress* para as células vegetativas. Na verdade, visto que a esporulação não constitui um mecanismo de proteção para determinados mesófilos totais – tal como a família das enterobactérias – e para a maioria das leveduras, estas não são capazes de se manterem viáveis, nas condições anteriormente apresentadas.

Os fungos filamentosos associados ao preparado de cereais foram quantificados sendo que foi registado lg (UFC/g) na ordem dos 2 apenas para o binómio tempo-temperatura de ingredientação de 1 h, 20 °C, visto tratar-se de uma temperatura próxima da temperatura ótima de crescimento destes microrganismos (25 °C). Nos restantes binómios tempo-temperatura verifica-se um decréscimo na sua quantificação, a níveis que se encontram abaixo do limite de deteção (lg (UFC/g) = 1). Este facto, possivelmente, permitirá concluir que não se trata de fungos filamentosos termorresistentes. Estes últimos possuem características, nomeadamente a produção de toxinas, capazes de constituir um risco para a saúde do consumidor, apresentando um desenvolvimento estável em temperaturas na ordem de 20 °C e 40 °C (Ferreira *et al.*, 2011).

De forma a caracterizar o preparado de cereais relativamente às suas propriedades físico-químicas foram realizadas leituras de pH, °Brix e temperatura do banho térmico ao longo do binómio tempo-temperatura de ingredientação. Os resultados encontram-se compilados na tabela 13.

Tabela 13 – Compilação dos parâmetros de °Brix (valor médio de 3 amostras ± 0,1), pH (valor médio de 3 amostras ± 0,01) e temperaturas mínima e máxima do preparado de cereais para diferentes binómios de tempo-temperatura de ingredientação

	Binómio de tempo-temperatura	° Brix	pH	Tmin (°C)	Tmáx (°C)
Preparado de Cereais	1 h, 20 °C	10,4	4,23	20,1	23,4
	3 h, 20 °C	10,6	4,22	20,1	23,4
	2 h, 40 °C	10,5	4,16	39,7	43,1
	3 h, 40 °C	11,0	4,14	39,7	43,1

O pH representa um dos fatores que influencia o crescimento dos microrganismos como se encontra descrito na literatura (Adams e Moss, 2000). Tal pode ser verificado devido à elevada carga em termos de leveduras quantificada no preparado de cereais que apresenta valores de pH entre os 4,14 e os 4,23, valores que se enquadram dentro da gama ótima de crescimento de leveduras e muito próximo dos valores ótimos de crescimento de fungos filamentosos.

4.3. Seleção e identificação de microrganismos-alvo

Após a análise dos resultados obtidos no âmbito da caracterização microbiológica realizada para a etapa de ingredientação, foram isolados os microrganismos com especial relevância, nomeadamente, as bactérias formadoras de esporos. Para isso foi tido em conta (1) a repetibilidade entre amostras; (2) as características de termorresistência a si associadas, entre outros fatores, como descrito na secção 3.7. No total foram avaliadas:

- Sessenta e duas culturas puras de microrganismos formadores de esporos mesófilos aeróbios;
- Cinquenta e três culturas puras de microrganismos formadores de esporos termófilos aeróbios;
- Dezasseis culturas puras de microrganismos formadores de esporos mesófilos anaeróbios;
- Uma cultura pura de um microrganismo formador de esporos termófilo anaeróbio.

Após o isolamento em placa, foram selecionadas as colónias presentes nos preparados de amora, framboesa e cereais, quantificadas segundo a tipologia de bactérias mesófilas e termófilas aeróbias, com maior repetibilidade entre as diferentes condições (subcapítulo 4.2.) – identificadas na etapa de ingredientação. As colónias foram identificadas segundo sequenciação genética por RT-PCR, em laboratório externo (BIOPREMIER). Os resultados obtidos conduziram às seguintes identificações (Figura 23):

- O microrganismo A, identificado como *Bacillus* sp., foi isolado do preparado de cereais após este ter sido submetido a um binómio tempo-temperatura de ingredientação de 40 °C durante 3 h;
- O microrganismo B, identificado como *Bacillus* sp., foi isolado do preparado de framboesa de baixo °Brix após este ter sido submetido a um binómio tempo-temperatura de ingredientação de 40 °C durante 6 h;

- O microrganismo C, identificado como *Thermoactinomyces vulgaris/ intermedius*, foi isolado do preparado de framboesa depois deste ter sido submetido a um binómio tempo-temperatura de ingredientação de 35 °C durante 2 h;
- O microrganismo D, identificado como *Bacillus smithii*, foi isolado do preparado de cereais após este ter sido submetido a um binómio tempo-temperatura de ingredientação de 20 °C durante 1 h;
- O microrganismo E identificado como *Bacillus* sp. foi isolado do preparado de amora de elevado °Brix após este ter sido exposto ao binómio tempo-temperatura de ingredientação de 20 °C durante 3 h;
- O microrganismo H foi identificado como *Paenibacillus humicus* e os microrganismos F, G e H como *Bacillus* sp.;
- Os microrganismos F, G, H e I foram isolados dos preparados de framboesa de elevado °Brix submetido a um binómio tempo-temperatura de ingredientação de 35 °C durante 2 h; de amora de alto °Brix submetido a um binómio tempo-temperatura de ingredientação de 50 °C durante 4 h; de amora baixo °Brix exposto a um binómio tempo-temperatura de ingredientação de 35 °C durante 2 h; e framboesa elevado °Brix depois de exposto a um binómio tempo-temperatura de ingredientação de 60 °C, respetivamente.

Para alguns dos microrganismos identificados só foi possível conhecer o género. No entanto, a identificação do género *Bacillus* sugere que os microrganismos selecionados estão de acordo com o que seria expectável, visto que este género é associado à produção de esporos, pelo que poderão apresentar resistência ao tratamento térmico. É de salientar que, na ausência de contaminações cruzadas, visto não terem sido identificados outros microrganismos, o rigor na obtenção das culturas puras é validado.

Dos microrganismos identificados selecionaram-se quatro microrganismos – duas bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias e duas bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias – para determinação dos parâmetros de cinética de inativação térmica no preparado de framboesa e no preparado de cereais.

Sendo assim, como bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias selecionaram-se os microrganismos identificados na figura 23 como A e B e identificados como *Bacillus* sp. para o estudo no preparado de cereais e framboesa, respetivamente. No caso das bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias selecionaram-se os microrganismos C e D, identificados como *T.*

vulgaris/ intermedius e *B. smithii* para o estudo do comportamento de inativação cinética através da incorporação nos preparados de framboesa e cereais, respetivamente.

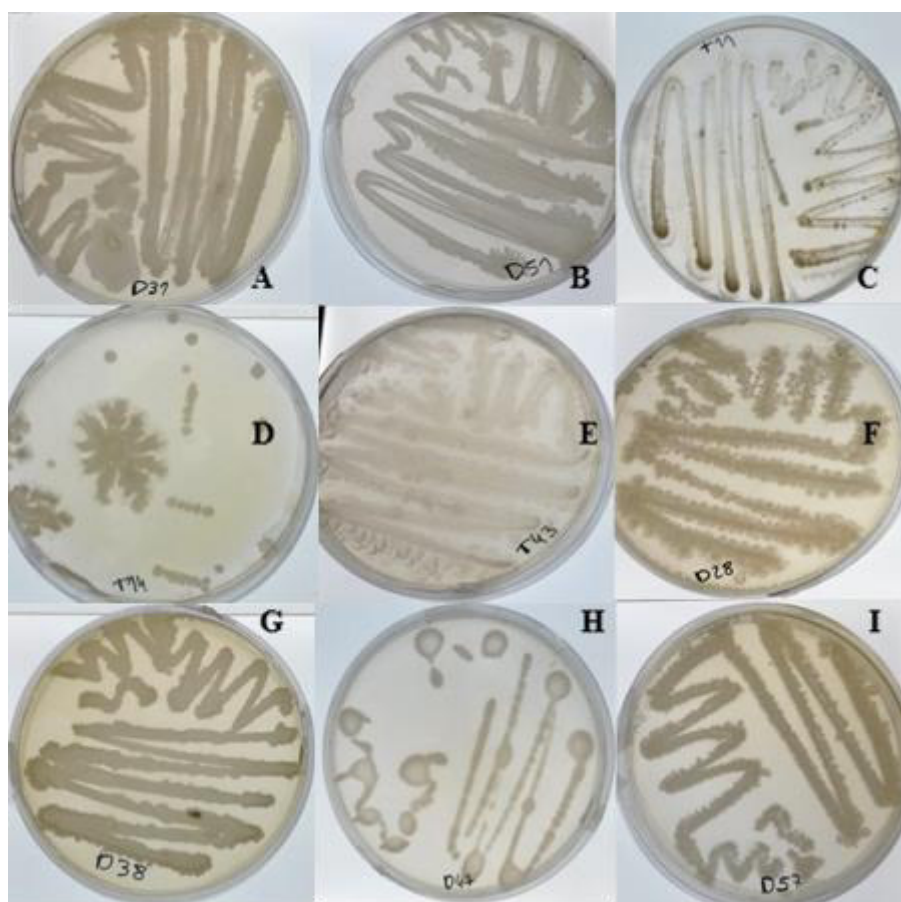


Figura 23 – Compilação das culturas puras de (A) *Bacillus* sp., (B) *Bacillus* sp., (C) *Thermoactinomyces vulgaris/ intermedius*, (D) *Bacillus smithii*, (E) *Bacillus* sp., (F) *Bacillus* sp., (G) *Bacillus* sp., (H) *Paenibacillus humicus* e (I) *Bacillus* sp.

A escolha destes microrganismos teve em conta a sua singularidade face a outros microrganismos identificados na mesma categoria. A escolha de microrganismos associados apenas ao preparado de framboesa e de cereais foi condicionada pelo tempo disponível para conduzir ensaios microbiológicos apenas para dois preparados. Sendo assim, a escolha baseou-se: (1) no histórico de análises microbiológicas e (2) no estudo de preparados com matrizes de origens diferentes – fruta e cereais.

4.4. Validação dos ensaios de avaliação do impacto de diferentes binómios tempo-temperatura de ingredientação, no comportamento da carga microbiana presente em matrizes FRULACT

4.4.1. Preparado de framboesa

Por forma a validar os resultados microbiológicos obtidos na etapa de ingredientação foi necessário produzir novamente os preparados anteriormente avaliados (subcapítulo 4.2.), submetendo-os às respetivas condições de ingredientação. No caso do preparado de framboesa, optou-se pela quantificação microbiana segundo a formulação com baixo e elevado °Brix, submetendo-se a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 2 h, 35 °C e a 3 h, 50 °C – acompanhado da monitorização do pH, °Brix e a_w (figura 24; tabela 14). A seleção dos binómios tempo-temperatura anteriormente apresentados baseia-se no comportamento microbiano, aquando da simulação das condições de ingredientação (subcapítulo 4.2.). Pela análise da figura 24, foi possível observar que o desenvolvimento de bactérias formadoras de esporos mesófilas e termófilas foi potenciado a temperaturas de 35 °C e 50 °C, respetivamente.

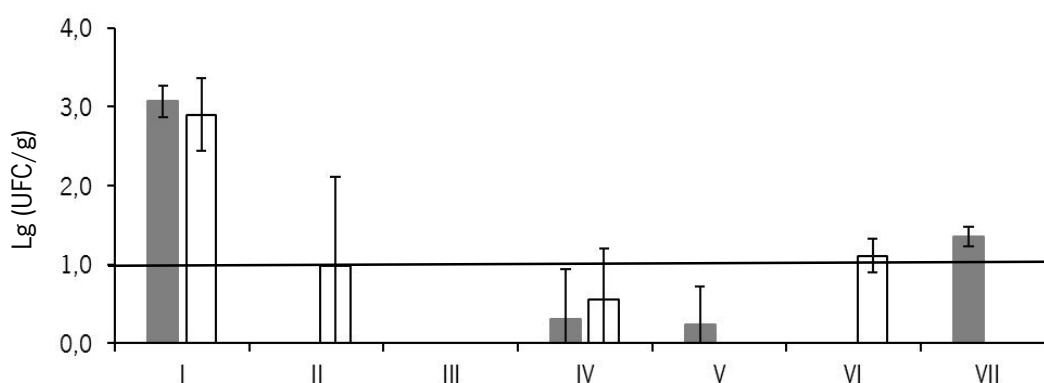


Figura 24 – Carga microbiana associada ao preparado de framboesa (baixo °Brix) para os binómios de tempo-temperatura de ingredientação de 2 h, 35 °C (■) e de 3 h, 50 °C (□) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão com limite de deteção de \lg (UFC/g) \geq 1.

Em comparação com a quantificação inicial de carga microbiana associada ao primeiro ensaio realizado para o preparado de framboesa de baixo °Brix, abordado na secção 4.2.2., é possível observar algumas diferenças, nomeadamente ao nível da análise de mesófilos totais e

leveduras. Anteriormente foram analisadas diferenças estatisticamente significativas, o que não acontece neste caso. Na fase anterior, foi possível verificar uma elevada quantificação de leveduras, o que não se verifica nesta nova análise (figuras 20 e 24). Dada a variabilidade dos diferentes lotes de matéria-prima utilizados – atendendo à sazonalidade das colheitas – bem como as condições de amostragem – no que concerne, nomeadamente ao tempo de descongelação – poderão existir variações quanto à quantificação microbiana.

Relativamente aos resultados obtidos na quantificação de carga microbiana associada ao preparado de framboesa de elevado °Brix, no segundo ensaio (figura 25) verifica-se a conformidade dos valores obtidos, quando comparados com o valor do primeiro ensaio (subcapítulo 4.2.2.; figura 21) – tendo por base a comparação com a quantificação inicial obtida para a matéria-prima.

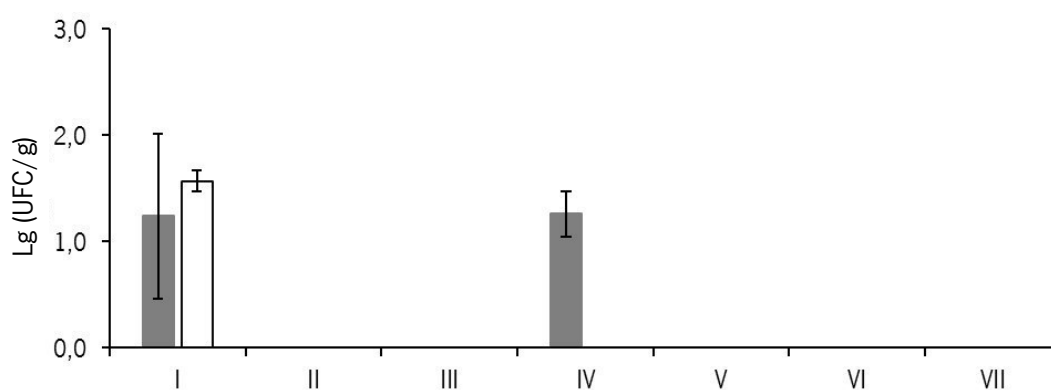


Figura 25 – Carga microbiana associada ao preparado de framboesa (elevado °Brix) para os binómios de tempo-temperatura de ingredientação de 2 h, 35 °C (■) e de 3 h, 50 °C (□) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão.

Mais ainda, foram também monitorizados os parâmetros físico-químicos: pH, a_w e °Brix – para as diferentes etapas do processo – antes e após os preparados de framboesa de baixo e elevado °Brix serem submetidos aos dois binómios tempo-temperatura de ingredientação (tabela 14).

Tabela 14 – Compilação dos parâmetros físico-químicos – °Brix (valor médio de 3 amostras \pm 0,1), pH (valor médio de 3 amostras \pm 0,01) e a_w (valor médio de 2 amostras \pm 0,001) – do preparado de framboesa (baixo e elevado °Brix) (parâmetros registados a 22 °C)

		Antes da ingredientação	Após o binómio de tempo-temperatura de ingredientação 2 h, 35 °C	Após o binómio de tempo-temperatura de ingredientação 3 h, 50 °C
Preparado de framboesa (baixo °Brix)	°Brix	7,2	7,6	8,3
	pH	3,3	3,5	4,1
	a_w	0,987	0,981	0,978
Preparado de framboesa (elevado °Brix)	°Brix	48,1	49,5	49,6
	pH	3,84	3,79	3,64
	a_w	0,964	0,959	0,957

4.4.2. Preparado de cereais

À semelhança do preparado de framboesa, foram validadas as análises microbiológicas realizadas aos binómios tempo-temperatura de ingredientação para o preparado de cereais (figura 26).

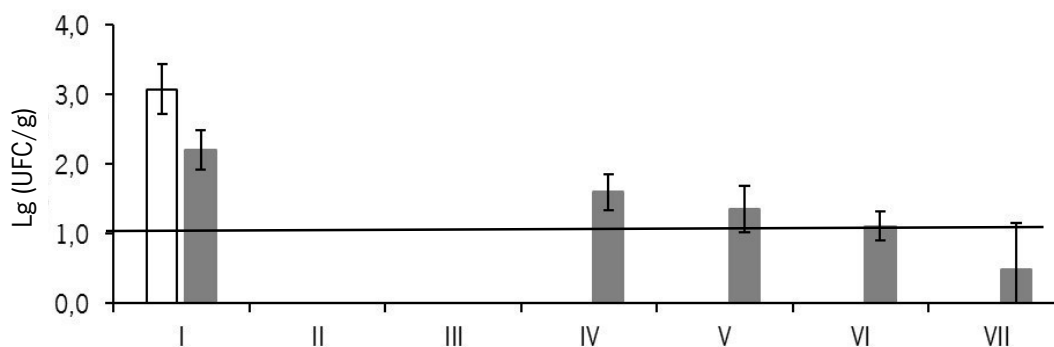


Figura 26 – Carga microbiana associada ao preparado de cereais para os binómios de tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 40 °C (□) e de 1 h, 50 °C (■) em termos de mesófilos totais (I), fungos filamentosos (II), leveduras (III), bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias (IV), bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias (V), bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias (VI) e bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias (VII). Os resultados correspondem ao valor médio de 4 amostras \pm desvio padrão com limite de deteção de \lg (UFC/g) \geq 1.

Os binómios tempo-temperatura selecionados para a presente etapa de validação, não coincidem com os testados na etapa de ingredientação (subcapítulo 4.2.3.). É importante ter em conta que, as condições ótimas de crescimento dos microrganismos que serão inoculados no preparado de cereais, o binómio tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 40 °C e 1 h, 50 °C favorecem o desenvolvimento de bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias e termófilas aeróbias, respetivamente.

De acordo com a figura 26 é possível verificar que existe apenas carga bacteriana formadora de esporos associada ao binómio tempo-temperatura de ingredientação de 1 h, 50 °C. O binómio tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 40 °C apenas apresenta carga microbiana quantificável em termos de mesófilos totais. Apesar de não ser possível uma comparação dos resultados do binómio tempo-temperatura de ingredientação de 1 h, 50 °C com os restantes resultados microbianos obtidos – uma vez que este não foi testado anteriormente porque não constava no histórico de binómios tempo-temperatura praticados na fábrica – a comparação direta do binómio tempo-temperatura de ingredientação 3 h, 40 °C pode ser uma mais valia.

No caso da aplicação de 3 h, 40 °C, na etapa de ingredientação, foi quantificada carga microbiana acima do limite de $\lg(\text{UFC/g}) = 1$ – em termos de mesófilos totais e de leveduras. Nesta fase do projeto não foi registada carga microbiana em termos de leveduras, tal pode estar relacionado com o aumento do binómio tempo-temperatura de ingredientação – 1 h, 50 °C – uma vez que anteriormente foi possível verificar a diminuição da concentração destes microrganismos associado a este fenómeno (figura 22). Apesar de estar abaixo do limite de deteção, na fase anterior, foi quantificada carga microbiana associada ao preparado de cereais em termos de microrganismos formadores de esporos mesófilos aeróbios, termófilos aeróbios e mesófilos anaeróbios.

Simultaneamente, de modo a caracterizar o preparado de cereais relativamente às suas propriedades físico-químicas, foram efetuadas leituras a três diferentes parâmetros: o pH, o °Brix e a atividade da água (a_w) (tabela 15).

Devido ao seu pH e ao valor de a_w , o preparado de cereais possui características favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes nomeadamente de leveduras e fungos filamentosos (Baptista e Venâncio, 2003).

Tabela 15 – Compilação dos parâmetros físico-químicos – °Brix (valor médio de 3 ensaios $\pm 0,1$), pH (valor médio de 3 amostras $\pm 0,01$) e a_w (valor médio de 2 amostras $\pm 0,001$) do preparado de cereais (parâmetros registados a 22 °C)

	Antes da ingredientação	Após o binómio de tempo- temperatura de ingredientação	Após o binómio de tempo- temperatura de ingredientação
		3 h, 40 °C	1 h, 50 °C
°Brix	10,4	11,5	11,4
pH	3,90	4,15	4,00
a_w	0,984	0,979	0,981

4.5. Determinação dos parâmetros de cinética de inativação térmica

De modo a determinar os parâmetros de cinética de inativação térmica dos microrganismos selecionados, foram realizados ensaios laboratoriais de forma a estudar o seu comportamento face a diferentes binómios tempo-temperatura de pasteurização aplicados. O estudo do comportamento microbiano irá permitir a determinação do valor de D e de z que, posteriormente, permitirão ajustar as condições de pasteurização, de acordo com os microrganismos a inativar – garantindo a segurança alimentar do preparado final.

Antes de se proceder à inoculação, foi necessário submeter o preparado a um binómio tempo-temperatura de pasteurização de 100 °C, 5 min. De acordo com o histórico de ensaios microbiológicos associados tanto para o preparado de cereais, como para o preparado de framboesa, foi necessário submeter os mesmos às condições de pasteurização anteriormente apresentadas. A aplicação de temperaturas na ordem de 100 °C, permite evitar a presença de eventual carga bacteriana esporulada capaz de sobreviver ao tratamento térmico que, conseqüentemente, poderá conduzir a falsos positivos – interferindo com os resultados microbiológicos do presente ensaio. É de salientar que, o estudo das características físico-químicas do preparado ao longo do processo produtivo é importante, na medida em que estas são afetadas pelo calor – e.g. as perdas de água afetam os valores de a_w e, por conseguinte, a sobrevivência microbiana, valores estes confirmados pelos valores medidos, aquando da aplicação do tratamento térmico. O mesmo se verifica para os valores de °Brix, estando de acordo com o teoricamente esperado, visto que o °Brix e a a_w estão diretamente relacionados, i.e. o aumento do °Brix tem o efeito inverso no valor de a_w (Tabela 16).

Tabela 16 – Valores de °Brix (valor médio de 3 amostras $\pm 0,1$) e a_w (valor médio de 2 amostras $\pm 0,001$) ao longo do processo associados ao preparado de framboesa e de cereais

		Binómio de tempo-temperatura de ingredientação				
		Antes da ingredientação	2 h, 35 °C	3 h, 40 °C	1 h, 50°C	3 h, 50 °C
Preparado de framboesa (baixo °Brix)	°Brix	7,2	7,6			8,3
	a_w	0,987	0,981			0,978
Preparado de framboesa (elevado °Brix)	°Brix	48,1	49,5			49,6
	a_w	0,964	0,959			0,957
Preparado de cereais	°Brix	10,4		11,5	11,4	
	a_w	0,984		0,979	0,981	

4.5.1. Preparado de framboesa

4.5.1.1. Bactéria formadora de esporos mesófila aeróbia: *Bacillus* sp.

De forma a determinar os parâmetros de cinética de inativação térmica para o preparado de framboesa de baixo e elevado °Brix, foi aplicado o protocolo descrito no subcapítulo 3.8. De acordo com o mesmo, o presente preparado foi inoculado com 5 % de *Bacillus* sp. (microrganismo B da figura 23).

O preparado, previamente pasteurizado (100 °C, 5 min), foi então inoculado e sujeito às condições de ingredientação anteriormente validadas (subcapítulo 4.4.1.) – 2 h, 35 °C e 3 h, 50 °C. Foram selecionados três binómios tempo-temperatura de pasteurização capazes de serem utilizados pela FRULACT, de acordo com as características do preparado, sendo eles: 85 °C, 5 min; 90 °C, 4 min; 95 °C, 5 min. Os ensaios foram também monitorizados de acordo com os tempos: 1, 2, 3, 3,5, 4, 4,5 e 5 min – aplicando o protocolo anteriormente descrito (subcapítulo 3.8.2.). Os ensaios foram realizados em duplicado. Os resultados dos testes laboratoriais encontram-se compilados na tabela 17 e os valores intermédios calculados para a determinação dos valores de D e de z para *Bacillus* sp. no preparado encontram-se compilados em anexo (Anexo C: tabelas C1, C2, C3 e C4).

Tabela 17 – Compilação dos valores de D e z para *Bacillus sp.* presente no preparado de framboesa de baixo e elevado °Brix. Os resultados correspondem ao valor médio de 2 ensaios \pm desvio padrão

		Valores de D (min)			Valor de z (°C)			
		85 °C	90 °C	95 °C	z (°C)	Desvio padrão	Média	
		5 min	4 min	5 min				
Framboesa (8,0 \pm 0,4 °Brix)	1º ensaio 2 h, 35 °C	5,62	1,45	0,85	12,20	2,60	14,03	
	2º ensaio 2 h, 35 °C	6,25	1,39	1,48	15,87			
	1º ensaio 3 h, 50 °C	4,66	2,21	1,92	25,64	5,04	22,08	
	2º ensaio 3 h, 50 °C	6,68	1,84	1,92	18,52			
	Framboesa (49,6 \pm 0,1 °Brix)	1º ensaio 2 h, 35 °C	4,52	2,67	1,37	45,46	0,00	45,46
		2º ensaio 2 h, 35 °C	3,76	3,43	2,30	45,46		
1º ensaio 3 h, 50 °C		4,71	3,40	2,77	34,70	17,06	46,76	
2º ensaio 3 h, 50 °C		4,82	4,16	3,24	58,82			

Através da tabela 17 verifica-se que o valor de D, diminui com o aumento da temperatura de pasteurização, como seria de esperar (Morais, 2012). Este comportamento traduz o facto de ser necessário um intervalo de tempo mais curto para garantir a redução de um ciclo logarítmico da carga microbiana presente, numa determinada matriz, à medida que se aumenta a temperatura. Mais ainda, quando sujeito a um binómio tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 50 °C a termorresistência microbiana aumenta, o que se traduz pela necessidade de aplicação de um valor de z maior – quando comparado com um binómio tempo-temperatura de 2 h, 35 °C. Isto significa que é necessário um incremento de temperatura maior para que seja possível a aplicação de um menor valor de D.

Após conhecer os valores de D e z, é calculado o binómio tempo-temperatura para garantir a correta inativação microbiana. Para isso, aplicando a equação, e considerando a redução de *Bacillus sp.* em 5 ciclos logarítmicos – segundo a FDA, 10^5 é o limite para microrganismos patogénicos – obtém-se os resultados apresentados na tabela 18.

É necessário ter em conta que, os parâmetros de cinética de inativação térmica de pasteurização variam conforme a espécie microbiana, bem como a matriz analisada. Atendendo a que não foi possível fazer a identificação da espécie bacteriana, em laboratório externo, não é exequível uma comparação direta entre os valores obtidos e os documentados na literatura.

Tabela 18 – Compilação da simulação do binómio de tempo-temperatura de pasteurização a aplicar para *Bacillus sp.* no preparado de framboesa

Binómio de tempo-temperatura de ingredientação	Preparado de framboesa de baixo °Brix	Preparado de framboesa de elevado °Brix
2 h, 35 °C	100 °C, 1 min	100 °C, 9 min
3 h, 50 °C	100 °C, 4 min	100 °C, 12 min

Em suma, através dos testes laboratoriais foi possível verificar um aumento da termorresistência do *Bacillus sp.* com: (1) o aumento do tempo de permanência na etapa de ingredientação; (2) o aumento da temperatura de ingredientação; e (3) com o aumento do °Brix – concentração de açúcares – como seria de esperar, visto que se encontra referenciado que o aumento da concentração de açúcares, numa determinada matriz, aumenta a termorresistência microbiana que, por sua vez, aumenta a resistência ao tratamento térmicos (Adams e Moss, 2000; Desai e Varadaraj, 2010; Jay *et al.*, 2005).

4.5.1.2. Bactéria formadora de esporos termófila aeróbia: *Thermoactinomyces vulgaris/intermedius*

De forma a determinar os valores de D e z foram conduzidos ensaios laboratoriais semelhantes aos aplicados para o *Bacillus sp.* (subcapítulo 3.8.) contemplando os mesmos preparados de framboesa. Os resultados obtidos encontram-se compilados na tabela 19 e os valores intermédios registados para a determinação dos valores de D e de z para *T. vulgaris/intermedius*, encontram-se compilados em anexo (Anexo C: tabela C5, C6, C7 e C8).

Através da tabela 19 é possível constatar uma diminuição do valor de D com o aumento do binómio tempo-temperatura de pasteurização, estando de acordo com o esperado – como já abordado no subcapítulo anterior (4.5.1.1.) (Adams e Moss, 2000). Aparentemente, existe menos dificuldade em reduzir a população de *T. vulgaris* nos preparados de framboesa que estiveram sujeitos a um binómio tempo-temperatura de ingredientação de 2 h, 35 °C, visto que os resultados expressam menores valores de z para estes preparados.

Tabela 19 – Compilação dos valores de D e z para *T. vulgaris/intermedius* presente no preparado de framboesa de baixo e elevado °Brix. Os resultados correspondem ao valor médio de 2 ensaios \pm desvio padrão

		Valores de D (min)			Valor de z (°C)		
		85 °C 5 min	90 °C 4 min	95 °C 5 min	z (°C)	Desvio padrão	Média
Framboesa (8,0 \pm 0,4 °Brix)	1º ensaio 2 h, 35 °C	13,00	3,41	1,61	11,11	0,17	10,99
	2º ensaio 2 h, 35 °C	11,92	3,04	1,46	10,87		
	1º ensaio 3 h, 50 °C	8,56	8,48	4,14	32,26	36,12	57,80
	2º ensaio 3 h, 50 °C	4,26	1,74	3,23	83,33		
Framboesa (49,6 \pm 0,1 °Brix)	1º ensaio 2 h, 35 °C	97,09	32,15	1,67	5,65	3,08	7,82
	2º ensaio 2 h, 35 °C	13,16	3,62	1,33	10,01		
	1º ensaio 3 h, 50 °C	6,25	6,56	3,41	37,04	20,96	51,85
	2º ensaio 3 h, 50 °C	2,70	2,49	1,89	66,67		

Efetivamente, dado tratar-se de uma bactéria formadora de esporos termófila aeróbia, é esperado que o *T. vulgaris* apresente uma maior resistência térmica estando exposto a um binómio

tempo-temperatura de ingredientação próximo das suas condições ótimas de crescimento (3 h, 50 °C) (Jay *et al.*, 2005). De acordo com os dados obtidos no presente ensaio, observa-se uma tendência para o aumento do valor de z, face ao aumento do binómio tempo-temperatura de ingredientação, demonstrando assim uma maior resistência térmica da espécie *T. vulgaris* quando exposta a 3 h, 50 °C.

Pela análise dos preparados de framboesa formulados segundo um baixo e elevado °Brix, não foi possível estabelecer uma relação entre a termorresistência bacteriana e a presença de açúcar, tal poderá estar relacionado com os desvios associados a cada um dos ensaios realizados. No caso do preparado de framboesa de baixo °Brix, o valor de z apresenta um valor médio de $57,80 \pm 36,12$ °C, enquanto que o preparado de framboesa de elevado °Brix apresenta um valor de z de $51,85 \pm 20,96$ °C. A realização de um terceiro ensaio laboratorial poderia estabelecer um valor médio de z mais próximo do real, diminuindo o desvio padrão associado.

Conhecendo os valores de D e z, nas condições apresentadas, procedeu-se à avaliação do binómio tempo-temperatura de pasteurização adequado para a inativação do *T. vulgaris*. Recorrendo à equação 3, os resultados espelham a tendência para o aumento da termorresistência, com o aumento do binómio tempo-temperatura de ingredientação a que o preparado de fruta foi anteriormente submetido (tabela 20). A relação entre a termorresistência do microrganismo e o °Brix – no caso particular do binómio tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 50 °C – não se encontra de acordo com o esperado, visto que não se verifica o aumento da termorresistência com o aumento do °Brix. No entanto, as diferenças constatadas poderão estar relacionadas com o desvio padrão associado aos ensaios laboratoriais (Adams e Moss, 2000; Jay *et al.*, 2005).

Tabela 20 – Compilação da simulação do binómio de tempo-temperatura de pasteurização a aplicar para *T. vulgaris* no preparado de framboesa

Binómio de tempo-temperatura de ingredientação	Preparado de framboesa de baixo °Brix	Preparado de framboesa de elevado °Brix
2 h, 35 °C	100 °C, 2 min	100 °C, 5 min
3 h, 50 °C	100 °C, 17 min	100 °C, 15 min

De acordo com Fergus (1967), a resistência térmica registada para *T. vulgaris*, a 100 °C numa solução de sacarose foi de 4 h, o que comprova a termorresistência associada a este

microrganismo quando colocado em condições ótimas de crescimento, nomeadamente a exposição a nutrientes indispensáveis ao seu desenvolvimento.

Ao longo do tempo de pasteurização foi observada uma diminuição da quantificação microbiana, tendo sido mais efetiva nos tempos de monitorização de 3 e 4 min. Neste intervalo foi observado um aumento da capacidade bacteriana em resistir às condições do tratamento térmico. Esta característica pode revelar-se importante, sendo necessário a realização de ensaios laboratoriais adicionais – cuja monitorização dos tempos de pasteurização contemple um maior número de pontos de amostragem – de forma a estudar o comportamento microbiano ao longo do processamento térmico. Desta forma, seria possível determinar os parâmetros de pasteurização de uma forma mais precisa, tendo em conta o comportamento do microrganismo a partir do momento que se verifica sua diminuição significativa ao longo do tempo.

4.5.2. Preparado de cereais

Os ensaios laboratoriais conduzidos para o estudo do preparado de cereais, seguiram as mesmas linhas orientativas dos restantes preparados (subcapítulo 4.5.1.). Para este preparado, foi apenas testada uma formulação ($^{\circ}\text{Brix } 11,5 \pm 0,1$), contemplando também diferentes binómios tempo-temperatura de ingredientação – 3 h, 40 °C e 1 h, 50 °C.

4.5.2.1. Bactéria formadora de esporos mesófila aeróbia: *Bacillus* sp.

O microrganismo formador de esporos presente no preparado de cereais foi identificado como *Bacillus* sp.. Os dados obtidos encontram-se compilados na tabela 21, bem como os valores intermédios para o cálculo dos parâmetros finais (Anexo C: tabela C9, C10).

Os dados obtidos para o *Bacillus* sp. no preparado de cereais demonstram uma diminuição do valor de D com o aumento do binómio de tempo-temperatura de pasteurização. Relativamente ao valor de z, este não apresenta diferenças significativas entre os dois binómios tempo-temperatura de ingredientação aplicados.

Apesar de não ter sido possível a identificação da espécie de *Bacillus* sp. isolada no preparado cereais, a termorresistência característica do género *Bacillus* sp. e dos seus esporos encontra-se referenciada na literatura, nomeadamente os de *B. cereus*. Segundo Desai e Varadaraj (2000), a redução logarítmica de células vegetativas pertencentes à espécie *B. cereus* através do processo de pasteurização é mais simples, no sentido que a temperatura a aplicar necessita de um binómio

tempo-temperatura mais baixo, quando comparado com binómio necessário para reduzir um ciclo logarítmico de esporos quantificados da mesma espécie.

Tabela 21 – Compilação dos valores de D e z para *Bacillus* sp. inoculado no preparado de cereais. Os resultados correspondem ao valor médio de 2 ensaios \pm desvio padrão

	Valores de D (min)		Valor de z (°C)		
	85 °C	90 °C	z (°C)	Desvio Padrão	Média
1º ensaio 1 h, 50 °C	4,20	2,57	23,47	4,19	20,51
2º ensaio 1 h, 50 °C	3,81	1,98	17,54		
1º ensaio 3 h, 40 °C	7,44	2,37	10,07	12,91	19,20
2º ensaio 3 h, 40 °C	2,50	1,67	28,33		

Conhecido o valor de D e z e após aplicação da equação 3, os valores adequados para reduzir a concentração de *Bacillus* sp. em 5 ciclos logarítmicos foram compilados na tabela 22.

Tabela 22 – Compilação da simulação do binómio de tempo-temperatura de pasteurização a aplicar para *Bacillus* sp. no preparado de cereais

Binómio de tempo-temperatura de ingredientação	Preparado de cereais
1 h, 50 °C	100 °C, 4 min
3 h, 40 °C	100 °C, 3 min

4.5.2.2. Bactéria formadora de esporos termófila aeróbia: *Bacillus smithii*

Tendo em conta as limitações de tempo para a realização deste trabalho, o *B. smithii* foi apenas testado para o binómio tempo-temperatura de ingredientação capaz de favorecer o seu desenvolvimento. Atendendo às características a si inerentes visto que esta bactéria é termófila, o binómio tempo-temperatura de ingredientação favorável ao seu crescimento é o de 1 h, 50 °C. Os

resultados obtidos para os ensaios laboratoriais com *B. smithii* no preparado de cereais encontram-se compilados na tabela 23 e os valores intermédios encontram-se compilados nas tabelas C11 e C12 (Anexo C). Através dos resultados obtidos é possível verificar a diminuição do valor de D com o aumento da temperatura do binómio tempo-temperatura de pasteurização aplicado.

Tabela 23 – Compilação dos valores de D e z para *B. smithii* inoculado no preparado de cereais. Os resultados correspondem ao valor médio de 2 ensaios \pm desvio padrão

	Valores de D (min)			Valor de z (°C)		
	85 °C 5 min	90 °C 4 min	95 °C 5 min	z (°C)	Desvio padrão	Média
1° ensaio						
1 h, 50 °C	3,64	1,60	1,42	24,39		
2° ensaio					11,04	32,20
1 h, 50 °C	1,70	1,01	0,96	40,00		

O *B. smithii* apresenta capacidade de esporulação numa gama de temperatura entre os 37 °C e os 55 °C. De acordo com André *et al.*, (2013) este microrganismo apresenta um D de 10 min para temperaturas entre os 105 °C e os 113 °C o que, pela análise dos dados obtidos não se verifica. Aplicando a equação 3, para o binómio tempo-temperatura de pasteurização, ajustado à redução de 5 ciclos logarítmicos deste microrganismo, seria necessário a utilização de uma temperatura de 100 °C durante 3 min para permitir a sua completa inativação.

Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras

Depois de analisados os dados obtidos é possível afirmar que os principais objetivos propostos para este trabalho foram cumpridos – nomeadamente a caracterização das matérias-primas, em particular bagas e cereais – e a caracterização dos preparados alvo do projeto depois de expostos a diferentes binómios de tempo-temperatura de ingredientação. De uma forma mais específica foram determinados os parâmetros de cinética de inativação térmica, o valor de D e z, de quatro microrganismos formadores de esporos isolados dos preparados alvo – dois mesófilos aeróbios identificados como *Bacillus* sp. no preparado de framboesa e no preparado de cereais e dois termófilos aeróbios identificados como *T. vulgaris/intermedius* e *B. smithii* identificados no preparado de framboesa e cereais, respetivamente.

Através das análises microbiológicas foi possível verificar a elevada carga microbiana associada a bagas e cereais, conforme se encontra descrito na literatura e principalmente em dados internos e fichas técnicas da empresa. Tendo em conta estes dados, estas matérias-primas são consideradas de risco no momento da aplicação de metodologias capazes de inativar os microrganismos no produto final de forma a garantir a segurança alimentar para o consumidor.

As análises microbiológicas efetuadas aos preparados de amora, framboesa e cereais demonstraram que o binómio de ingredientação aplicado influencia a carga microbiana associada ao preparado, sendo que a aplicação de um binómio de ingredientação que apresente condições favoráveis de crescimento microbiano irá aumentar a carga microbiológica associada a esse preparado. Na etapa de caracterização da carga microbiana associada aos preparados de bagas e cereais foi ainda possível verificar a influência do valor de pH no aumento do desenvolvimento microbiano.

Relativamente aos parâmetros de pasteurização foi possível concluir que o *Bacillus* sp. no preparado de framboesa de baixo °Brix apresenta um $D_{90\text{ °C}}$ de $1,42 \pm 0,03$ min e um valor de z de $14,03 \pm 2,60$ °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 2 h, 35 °C e um $D_{90\text{ °C}}$ de $2,03 \pm 0,19$ min e um valor de z de $22,08 \pm 5,04$ °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 50 °C. No caso do preparado de framboesa de elevado °Brix, este apresenta um $D_{90\text{ °C}}$ de $3,05 \pm 0,38$ min e um valor de z de $45,46 \pm 0,00$ °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 2 h, 35 °C e um $D_{90\text{ °C}}$ de $3,68 \pm 0,48$ min e um valor de z de $46,76 \pm 17,06$ °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 50 °C.

Relativamente aos parâmetros de pasteurização foi possível concluir que o *T. vulgaris / intermedius* no preparado de framboesa de baixo °Brix apresenta um $D_{90}^{\circ\text{C}}$ de $3,23 \pm 0,19$ min e um valor de z de $10,99 \pm 0,17$ °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 2 h, 35 °C e um $D_{90}^{\circ\text{C}}$ de $5,11 \pm 3,37$ min e um valor de z de $57,80 \pm 36,12$ °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 50 °C.

De igual forma foi possível determinar os parâmetros de pasteurização de *T. vulgaris / intermedius* no preparado de framboesa de elevado °Brix concluindo que este apresenta um $D_{90}^{\circ\text{C}}$ de $17,89 \pm 14,27$ min e um valor de z de $7,82 \pm 3,08$ °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 2 h, 35 °C e um $D_{90}^{\circ\text{C}}$ de $4,53 \pm 2,04$ min e um valor de z de $51,85 \pm 20,96$ °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 50 °C. Relativamente, ao género *Bacillus* sp. no preparado de cereais este apresenta um $D_{90}^{\circ\text{C}}$ de $2,28 \pm 0,30$ min e um valor de z de $20,51 \pm 4,19$ °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 1 h, 50 °C e um $D_{90}^{\circ\text{C}}$ de $2,02 \pm 0,35$ min e um valor de z de $19,20 \pm 12,91$ °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 40 °C.

Os testes realizados com *B. smithii* demonstraram que este apresenta um valor de D de $1,31 \pm 0,30$ min e um valor de z de $32,20 \pm 11,04$ °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 1 h, 50 °C.

Após realização da simulação dos diferentes tempo-temperaturas de pasteurização foi possível verificar que o microrganismo mais resistente ao binómio aplicado foi o *T. vulgaris / intermedius* sendo necessários 17 min e 15 min – a 100 °C – para diminuir 5 ciclos logarítmicos deste microrganismo no preparado de baixo °Brix e elevado °Brix, respetivamente, quando exposto a um binómio de ingredientação de 3 h, 50 °C. Após ser exposto a um binómio de ingredientação de 2 h, 35 °C, estes valores diminuem para 2 min e 5 min, respetivamente.

Após a realização da simulação para *Bacillus* sp. verificou-se a necessidade de aplicar um binómio de tempo-temperatura de pasteurização de 12 min e 9 min a 100 °C depois do preparado de framboesa de baixo e elevado °Brix, respetivamente, ter sido exposto a um binómio tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 50 °C. No entanto, depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de 2 h, 35 °C estes valores diminuem para 4 min e 1 min, respetivamente.

Relativamente aos microrganismos isolados do preparado de cereais, o *Bacillus* sp. necessita da aplicação de um binómio de tempo-temperatura de pasteurização de 4 min, 100 °C depois de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 1 h, 50 °C enquanto que depois

de exposto a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 3 h, 40 °C este valor diminui para 3 min – valor análogo ao necessário para reduzir em 5 ciclos logarítmicos a população de *B. smithii* após a exposição a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação de 1 h, 50 °C.

Concluindo, verificou-se que parâmetros como o °Brix, o pH, a a_w e o binómio de tempo-temperatura de ingredientação ao qual o preparado é submetido influenciam e podem potenciar a termorresistência associada aos microrganismos. Mais especificamente, foi possível verificar que o aumento do °Brix e a exposição a um binómio de tempo-temperatura de ingredientação favorável ao crescimento do microrganismo aumenta a termorresistência que lhe está associada.

A nível de formação académica, a realização deste projeto permitiu a aplicação de conhecimentos teóricos, assim como adquirir conhecimentos científicos na área alimentar, de formulação de preparados de fruta e da análise de alimentos, nomeadamente a nível da qualidade, revelando-se por isso uma experiência enriquecedora.

A nível pessoal, a realização do estágio curricular numa empresa com enorme relevo no mercado alimentar nacional e internacional, possibilitou uma experiência mais próxima com o mercado de trabalho assim como adquirir autonomia e responsabilidade pelo trabalho desenvolvido.

Para futuros trabalhos, aconselha-se a realização de novos ensaios para validação de alguns pontos cujo comportamento microbiano não ficou claro e recomenda-se o teste de binómios tempo-temperatura de pasteurização, com aplicação de tempos mais prolongados de modo a observar o comportamento microbiano. No futuro, seria interessante aplicar o estudo da termorresistência a outros microrganismos isolados das matérias-primas utilizadas neste estudo e se possível, a outros preparados de fruta, de forma a avaliar os comportamentos adotados por diferentes microrganismos em preparados de fruta elaborados a partir da mesma tipologia de matéria-prima. De forma análoga, seria interessante o estudo do impacto da aplicação dos binómios de tempo-temperatura de pasteurização nas características organoléticas do produto final.

Em suma, com este trabalho de investigação foi possível verificar a termorresistência associada a determinados microrganismos e o risco que estes representam para o produto final e para a saúde do consumidor. O estudo do comportamento dos microrganismos presentes nos produtos fabricados pela empresa permite a escolha de um binómio tempo-temperatura de pasteurização adequado, por forma a manter os níveis microbianos a níveis aceitáveis, apresentando condições aceitáveis para a comercialização do produto final – ao nível da segurança

alimentar. O estudo realizado ao longo deste projeto também demonstrou que a aplicação de binómios tempo-temperatura de ingredientação com gamas de temperatura mais baixas facilitam a eliminação de microrganismos esporulados, por outro lado, a manutenção de binómios tempo-temperatura de ingredientação com temperaturas que se incluem na gama ótima dos microrganismos esporulados aumentam a sua termorresistência e, por conseguinte, a dificuldade de eliminação destes através dos binómios de pasteurização utilizados. É de salientar que, inerente a este facto terão sempre de ser tidos em conta os microrganismos deteriorantes – nomeadamente leveduras – cuja manutenção de temperaturas mais baixas no processo de ingredientação, poderá não ser considerada ótima para evitar o seu desenvolvimento. Neste sentido, a empresa deverá ajustar a etapa de ingredientação com binómios tempo-temperatura capazes de impedir o desenvolvimento microbiano, aquando das produções que diariamente são realizadas.

Referências Bibliográficas

- Adams, M. R. e Moss, M. O. (2000). *Food Microbiology*, 2nd ed. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry
- Agrocluster (2015). *Tendências do mercado alimentar da União Europeia. Aspetos do consumo, produto, distribuição e comunicação*. Consultado a 17/08/2016. Disponível online em: http://www.agrocluster.com/conteudos/File/Estudos%20Agrocluster/Estudo%20Tendencia/Tendencias_UE.pdf
- AJAP e Agri-Ciência, (2009). *Gestão da Empresa Agrícola no Século XXI. Manual I – Marketing dos Produtos Agro-Pecuários*. Elaboração Conjunta AJAP e Agri-Ciência. Lisboa. Consultado a 3/06/2016. Disponível online em: <http://www.ajap.pt/media/MANUALI.pdf>
- Almeida, I., Guiné, R. e Costa, E. (2010). *Caracterização bioquímica e fúngica de peras e outros frutos secados*. Documento de congresso: 1º Encontro Português de Secagem de Alimentos. Escola Superior Agrária de Viseu. Consultado em 20/03/2016. Disponível online em: http://repositorio.ipv.pt/bitstream/10400.19/1366/1/2010_Viseu_Acta_Poster%20Ines.pdf
- Amarante, C., Ruivo, M., Oliveira, M. e Moura, Q. (2010) Diversidade Microbiana em solos de Terra Preta Arqueológica. *Enciclopédia biosfera*, v. 6, n. 11, p. 1-10. Consultado a 15/06/2016. Disponível online em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2010c/diversidade.pdf>
- André, S., Zuber, F. e Remize, F. (2013). Thermophilic spore-forming bactéria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-years survey. *International Journal of Food Technology*. 165, p.134-143. Consultado a 2/8/2016. Disponível online em: http://ssu.ac.ir/cms/fileadmin/user_upload/Daneshkadaha/dbehdasht/behdasht_imani/art/Thermophilic-spore-forming-.pdf
- Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., Kumar, Y. e Kaur, M. (2014). Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *International Journal of Food Science 2014*, article ID 408085. Consultado 14/03/2016. Disponível online em: <https://www.hindawi.com/journals/ijfs/2014/408085/>

- Araújo, M. (2007). Safety e Security. Conceitos diferentes. Segurança e Qualidade Alimentar. *Revista Segurança e Qualidade Alimentar*, nº3, 62-63. Consultado a 16/04/2016. Disponível online em: <http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-03/Page%2062-63.pdf>
- Aydin, A., Pulsen, P. e Smulders, J. (2009). The physico-chemical and microbiological properties of wheat flour in Thrace. *Turkish journal of agriculture and forestry*. 33: 445-454.
- Baglioni, F., Gumerato, H. F. e Massaguer, P. R. (1999). Ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. *Food Science and Technology (Campinas)* vol.19 n.2. Consultado a 25/03/2016, disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611999000200019
- Baptista, P. e Venâncio, A. (2003). *Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos*. FORVISÃO – Consultoria em Formação Integrada, Lda., 1ª Edição. Guimarães, Portugal. Consultado a 28/02/2016. Disponível online em: repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/.../1/document_2748_1.pdf
- Batalha, M. e Buhain, M. (2007). *Cadeia Produtiva de Frutas*, Volume 7. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, Secretaria de Política Agrícola - SPA e Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura – IICA. Consultado a 18/06/2016. Disponível online em: http://www.ibraf.org.br/x_files/Documentos/Cadeia_Produtiva_de_Frutas_S%C3%A9rie_Agroneg%C3%B3cios_MAPA.pdf
- Batt, C. e Tortorello, M. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Second Edition. Elsevier. USA.
- Benamara, R., Ziane, M., Medjahdi K. e Moussa-Boudjemâa, B. (2016). Characterization of *Bacillus cereus* spores isolated from Algerian processed cheese. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 10 (30), pp. 1173-1181. Consultado a 26/8/2016. Disponível online em: <http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/BF3523559928>
- Berghofer, L., Hocking, A., Miskelly, D. e Jansson, E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *International Journal of Food Microbiology*. 85:137-149

- BlackMould* (2016). Information about mould and mould disease. Consultado a 16/07/2016. Disponível online em: <http://www.blackmould.me.uk/Stachybotrys%20toxic%20black%20mould.html>
- Burity V., Franceschini T., Valente F., Recine E., Leão M. & Carvalho M.F., (2010). *Direito humano à alimentação adequada no contexto de segurança alimentar e nutricional*. Brasília, DF: ABRANDH.
- Carvalho, I. T., (2010). *Microbiologia dos Alimentos*. Escola Técnica Aberta do Brasil.
- Carvalho, D. (2014). Grãos e farinhas integrais, amido resistente e a sua relação com diabetes e obesidade. *Factores de risco*. 33:40-50. Consultado a 6/08/2016. Disponível online em: <http://advancecare.pt/wp-content/uploads/2015/05/Gr%C3%A3os-e-farinhas-integrais...diabetes-e-obesidade.pdf>
- Cavalcante, D. de Andrade (2014). *Ultraesporo e termorresistência de esporos e identificação de proteínas de bactérias aeróbias do solo do Distrito Federal*. Dissertação para a obtenção de grau de Mestre em Biologia Microbiana. Universidade de Brasília. 109p.
- Christian J. H. B., Silliker J. H., Elliott R. P., Baird-Parker A. C., Bryan F. L., Clark D. S., Olson J. C. e Roberts T. A., (1980) – *Actividad de agua reducida em Ecologia microbiana de los alimentos*. Zaragoza, Editorial Acribia.
- Codex Alimentarius, (2003). *Código de práticas internacionais recomendadas; princípios gerais de higiene alimentar*. CAC/RCP 1-1969, Rev. 44
- Costa, L. (2011). *Compotas conquistam mercado*. Publicado a 7/7/2011. Consultado a 10/08/2016. Disponível online em: <http://www.cmjornal.pt/economia/detalhe/compotas-conquistam-mercado>
- CRFSFS (2003). Factors that Influence Microbial Growth. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 21–32. Consultado a 6/06/2016. Disponível online em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00048.x/abstract>
- Desai, S. e Varadaraj, M. (2010). Behavioural pattern of vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* as affected by time-temperature combinations used in processing of Indian

traditional foods. *Journal of Food and Science Technology*. 37(5):549-556. Consultado a 3/08/2016. Disponível online em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551094>

Doyle, M., Beuchat, L. e Montville, T. (1997). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology. Washington, DC.

Driks, A. (1999). The Bacillus subtilis spore coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(1), 1–20. Consultado a 12/07/2016. Disponível online em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98955/>

Duarte, J. (2011). *Contribuição da Microbiologia Preditiva na análise de cremes de pasteleiro*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar. 92p. Consultado a 16/07/2016. Disponível online em: https://run.unl.pt/bitstream/10362/5678/1/Duarte_2011.pdf

Eglezos, S. (2010). Microbiological Quality of Wheat Grain and Flour from Two Mills in Queensland, Australia. *Journal of Food Protection*. 73:1533-1536

Encyclopedia of Food Microbiology. (2014). Academic Press. Consultado a 28/04/2016. Disponível online em: <https://books.google.com/books?id=1b1CAgAAQBAJ&pgis=1>

FAO/WHO. 2008. *Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables – meeting report*. Consultado a 15/04/2016. Disponível online em: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA_FruitVegetables.pdf

Farmácia Minha Vida (2013). Coloração de esporos (Wirtz-Conklin). Consultado a 10/05/2016. Disponível online em: <http://farmaciaminhavida.blogspot.pt/2013/08/coloracao-de-esporos.html>

Fergus, C. (1967). Resistance of spores of some thermophilic *actinomycetes* to high temperature in *Mycopathologia et Mycologia Applicata* (1967) 32: 205-208.

Ferreira, E., Masson, L., Rosenthal, A., Souza, M., Tashima, L. e Massaguer, P. (2011). Termorresistência de fungos filamentosos isolados de néctares de frutas envasados

assepticamente. *Brazilian Journal of Food Technology* v.14, n°3, p, 164-171. Consultado a 10/08/2016. Disponível online em: <http://www.scielo.br/pdf/bjft/v14n3/01.pdf>

Fitenborg, O., Frivad J. C. e Thrane, U. (1996). Mould in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 33 (1): 85-102.

Fontana, D. (2009). *Elaboração de um modelo para o controle do processo de pasteurização em cerveja envasada*. Dissertação para obtenção do título em Mestre da Engenharia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, São Paulo, 122 p. Consultado a 30/08/2016. Disponível online em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/18596/000730351.pdf?sequence=1>

Fuchs, R. H. B., Borsato, D., Bona. E. e Haully, M. C. O., (2005). *Iogurte de soja suplementado com oligofrutose e inulina*. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, Campinas, v.25, n°1: 175- 181

Furlaneto, K. (2015). *Qualidade nutricional e aceitabilidade da geleia convencional e light de maná cubiu*. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Energia na Agricultura) 83 p. Consultado a 6/08/2016. Disponível online em: <http://www.pg.fca.unesp.br/Teses/PDFs/Arq1241.pdf>

Gaillard, S., Leguerinel, I. e Mafart, P. (1998). Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Food Science*. 63: 887-889

Gava, A., Silva, C. e Frias, J. (2008). *Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações*. Nobel. São Paulo.

Germano, P. e Germano. M. (2001). *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. 2ªed. São Paulo: Livraria Varela.

Giorno, R., Bozue. J., Cote, C., Wenzel, T., Sulayman, M., Krishna, M., Michael, R., Wang, R., Zielke, R., Maddock, J., Friedlander, A., Welkos, S. e Driks, A. (2007). Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* Spore. *Journal of bacteriology*, p. 691–705 Vol. 189, No. 30021-9193

- Gupta, V. e Gupta A. (2007) *General Microbiology*. Consultado a 16/07/2016. Disponível online em: http://nsdl.niscair.res.in/jspui/bitstream/123456789/137/1/Diversity_Microbial_World.pdf
- Helgason, E ., Okstad, O., Caugant, D., Johansen, H., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. e Kolstø, A. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6): 2627–2630.
- Hoffmann M.G.S. (2004). *Estudo de resistência térmica de Byssochlamys nivea e Talaromyces flavus em néctar de maçã*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Florianópolis, Santa Catarina: Universidade do Sul de Santa Catarina. 2004. 102p. Consultado a 25/03/2016. Disponível online em: <http://www.tede.ufsc.br/teses/PENQ0128.pdf>
- Holt, J. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology gram-positive bacteria other than actinomycetes*. Williams & Williams, Baltimore, MD.
- Houbraken, J., Samson, R. e Frisvad, J. (2006). *Byssochlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. Em: *Advances in Food Mycology*. Advances in Experimental Medicine and Biology; 571, 212-224.
- ICMSF, (2005). Soft drinks, fruit juices, concentrates and food preserves. Em: Microorganisms in Foods 6: *Microbial Ecology of Food Commodity* (ICMSF), Kluwer Academic Publisher.
- Jay, J., Loessner, M. e Golden, D. (2005). *Modern Food Microbiology*. Springer Science + Business Media, Inc. Seventh Edition.
- Jensen, B., Knudsen, I., Andersen, B., Nielsen, K., Thrane, U., Jensen, D. e Larsen, J. (2013). Characterization of microbial communities and fungal metabolites on field grown strawberries from organic and conventional production. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 160, Issue 3, p. 313-322.
- Jensen, N. (2000). *Alicyclobacillus* in Australia. *Food Australia* 52, 282–285.

- Kurtzman, C., Wickerham, L. e Hesselstine, C. (1970). Yeasts from Wheat and Flour. *Mycological Society of America*. Vol. 62, No. 3. Consultado a 27/04/2016. Disponível online em: https://www.jstor.org/stable/3757526?seq=1#page_scan_tab_contents
- Lerner, K. e Lerner, B. (Eds.) (2003). *World of Microbiology and Immunology*. Detroit: Gale
- Logan, N.A. e De Vos, P. (2009). Genus I. Bacillus Cohn 1872, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 174. Vol3. 2nd Edition.
- Logan, N. A., e Turnbull, P. (1999). *Bacillus and recently derived genera*, p. 357-369. Em: Murray, P. R., Baron E. J., Tenover, F. C. T, e Tenover, R. H, Manual of clinical microbiology, 7th ed., ASM Press, Washington, D.C.
- Lucas, R., Grande, M. J., Briouel, H., Maqueda, M., Bem Omar, N., Valdivia, E., Martinez-Cañámero, M. e Gálvez, A. (2006). Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit Bacillus coagulans in canned fruit and vegetable foods. *Food and Chemical Toxicology* 44:1774-1781
- Manthey, F., Wolf-Hall, C., Yalla, S., Vijayakumar, C. e Carlson, D. (2004). Microbial loads, mycotoxins, and quality of durum wheat from the 2001 harvest of the North Plains region of the United States. *Journal of Food Protection* 67:772-780.
- McKenney P., Driks A. e Eichenberger P. (2013). The Bacillus subtilis endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*. 33-44.
- Miller M. e Bassler B. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 165-99.
- Mlyneková, Z., Chrenková, M. e Formelová Z. (2014) Cereals and Legumes in Nutrition of People with Celiac Disease *International Journal of Celiac Disease*, 2014 2 (3), pp 105-109. Consultado a 23/08/2016. Disponível online em: <http://pubs.sciepub.com/ijcd/2/3/3/>
- Morais, I. (2012). *Inativação térmica de diferentes espécies de leveduras de alteração de vinhos*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Viticultura e Enologia. Instituto Superior de Agronomia Universidade Técnica de Lisboa. 56p. Consultado a 7/8/2016. Disponível

online em: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/5375/1/Tese%20provis%C3%B3ria%208%20Janeiro.pdf>

- Mostert, J., Luck, H. e Hurman, R. (1979). Isolation, identification and practical properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk. *South Africa Journal of Dairy Technology*. V.11, n.3, p 125-132.
- Mossel, D., Corry, J., Strujik, C. e Baird, R., (1995). *Essentials of the Microbiology of Foods: a Textbook for Advanced Studies*. John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Moura, Q., Ruivo, M., Rodrigues, H., Rocha, E., Silva Junior, J., Vasconcelos, S., Andrade, M. e Manes, C. (2015). Variação sazonal da população de bactérias e fungos e dos teores de nitrato e amônio do solo nos sítios do LBA e PPBIO, na Amazônia oriental. *Revista Brasileira de Meteorologia*, v. 30, n. 3, 265 – 274. Consultado a 29/07/2016. Disponível online em: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-778620140104>
- Nakayama, A., Yano Y., Kobayashi S., Ishikawa M. e Sakai K. (1996). Comparison of Pressure Resistances of Spores of Six *Bacillus* Strains with Their Heat Resistances. *Applied and environmental Microbiology*, 62(10): 3897-3900
- Ng, H., Bayne, H.G. e Garibaldi, J. A. (1969). Heat resistance of *Salmonella*. The uniqueness of *Salmonella senftenberg 775w*. *Applied Microbiology*, 17:78-82
- Niall, A.L. e Halket, G., (2011). Developments in the taxonomy of aerobic, endospore forming Bacteria em *Endospore forming soil bacteria*. Vol 27 1-7
- Nicholson, W., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. e Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(3):548-572. Consultado a 5/8/2016. Disponível online em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99004/>
- Oliveira, A., Rezende, C., Sola, M., Feistel, J. e Oliveira, J. (2013). Microbiologia preditiva. *Enciclopédia biosfera*. Consultado a 1/09/2016. Disponível online em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20AGRARIAS/Microbiologia%20Preditiva.pdf>

- Pariz, K.L.,(2011). Avaliação da qualidade microbiológica de polpas de frutas. Rio de Janeiro. 47 p. Consultado a 25/06/2016. Disponível online em: [http://www.bento.ifrs.edu.br/site/midias/arquivos/2012424102432265tcc\[15\]_completo_kelimar_levis_de_pariz.pdf](http://www.bento.ifrs.edu.br/site/midias/arquivos/2012424102432265tcc[15]_completo_kelimar_levis_de_pariz.pdf)
- Pelczar M., Reid R. e Chan E. (1980). *Microbiologia*. Brasil, MAKRON Books do Brasil Editora. Volume I: 315-363.
- Pereira, V., Doria, E., Junior, B., Silveira, V., e Filho, I. (2010). Avaliação de temperaturas em câmaras frigoríficas de transporte urbano de alimentos refrigerados e congelados. *Ciência e tecnologia de alimentos*, 30 (1): 158-165
- Pezente, L. (2011). *Características glicídicas e microbiológicas de méis de Apis mellifera produzidos em Roraima*. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais, na área de concentração em Bioprospecção. Universidade Federal de Roraima. 117p. Consultado a 16/07/2016. Disponível online em: http://www.bdtd.ufr.br/tde_arquivos
- Phung, D. (2013). *Structural studies of a toxin from Bacillus cereus that causes diarrhea*. Consultado a 30/8/2016. Disponível online em: <http://phys.org/news/2013-01-toxin-bacillus-cereus-diarrhea.html>
- Pinotti, M., Santos, J., Klaubergfilho, O., Michelluti, D e Castro, D. (2011). Isolation of soil fungi associated to the cultures of blackberry, raspberry and blueberry in Brazilian Southern highland. *Revista Brasileira de Agroecologia* 6 (1):67-80
- Ponce, A., Batiani, M., Minim, V. e Vanetti, C. (2009). Características físico-químicas e microbiológicas de morango minimamente processado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30 (1):113-8
- Prescott L., Harley J. e Klein D., (1996). *Microbiology* (3ª ed.). United States of America, Wm. C. brown Publishers: 503-515
- Ramos, B., Miller, F., Brandão, T., Teixeira, P. e Silva, C. (2013). Fresh fruits and vegetables – An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 20: 1-15.

- RASFF – *The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report 2014*. Consultado a 20/07/2016. Disponível online em: http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2014.pdf
- Richter, K., Dorneanu, E., Eskridge, K., Rao C. (1993). Microbiological quality of flours. *Cereal Foods World*. 38: 367–369
- Ritter (2007). *Ritter Alimentos SA*. Consultado a 23/06/2016. Disponível online em: <http://www.ritter.com.br/site/content/industrial/?produto=preparados-de-frutas>
- Rodrigues, H., Sá, L., Ruivo, M., Costa, A., Silva, R., Moura, Q. e Mello, I. (2011) Variabilidade quantitativa de população microbiana associada às condições microclimáticas observadas em solo de floresta tropical húmida. *Revista Brasileira de Meteorologia*, v.26, p.629-638.
- Rodrigues, F.; Ludovico, P. e Leão; C. (2006). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Part of the series The Yeast Handbook. Springer Berlin Heidelberg. pp 101-121. Consultado a 18/7/2016. Disponível online em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/6231/1/Ch06.pdf>
- Saddozai, A., Raza, S. e Saleem, S. (2012). Microbial count and shelf life of strawberry juice. *Pakistan Journal of Agricultural Research*. Vol. 25 No. 3, p. 218-223
- Salomão, B.C.M. (2002). *Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas*. Florianópolis, SC; Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). 120p. Consultado a 17/05/2016. Disponível online em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/83725/189355.pdf?sequencia=1>
- Salomão, B., Massaguer, P. e Aragão, G. (2008). Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes em etapas do processo produtivo de néctar de maçã. *Ciência Tecnologia Alimentar*. vol.28 no.1 Campinas.
- Sapers, M., Gorny, R. e Yousef, E. (2006). *Microbiology of Fruits and Vegetables*. Taylor & Francis Group, pp:167-169

- Scott, W. (1957). Water relation of food spoilage microorganisms. *Advances in Food Research*. Volume 7, Pages 83–127
- Sebastiany, E., Rego, E. e Vital, M. (2009). Qualidade microbiológica de polpas de frutas congeladas. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. São Paulo, Brasil.
- Seiler, D. (1986). The microbial content of wheat and flour, p. 35-40. Em *B. Flannigan* (ed), Proceedings of the spring meeting of the Biodeterioration Society on spoilage and mycotoxins of cereals and other stored products. C.A.B. International, Slough, UK.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal Applied Microbiology* 101(3):514– 525.
- Shaw, P., Moshonas, M., Hearn, C. e Goodner, K. (2000). Volatile constituents in fresh and processed juices from grapefruit and new grapefruit hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (6), pp 2425–2429.
- Silva, A. (2014). A nova vida da fruta. Artigo publicado na revista *Público* a 15 de Junho de 2014. Consultado a 5/06/2016. Disponível online em: <https://www.publico.pt/sociedade/noticia/a-nova-vida-da-fruta-1639665>
- Slongo, A., Miorelli, S. e Aragão, G. (2005). Influência de diferentes fatores na termorresistência de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão. *Revista Alimentos e Nutrição*, Araraquara v.16, n.4, p. 377-387. Consultado a 11/08/2016. Disponível online em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/498/461>
- Souza, R. (2014). *Esporos de Bacillus subtilis como adjuvante vacinal*. Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências. São Paulo, Brasil. 118 pp. Consultado a 23/07/2016. Disponível online em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-24022015-124003/pt-br.php>
- Sperber, W. (2007). Role of microbiological guidelines in the production and commercial use of milled cereal grains: a practical approach for the 21st century. *Journal of Food Protection*. 70:1041–53.

- Torrezan, R.; Eiroa, M. e Pfenning, L. (2000). Identificação de microrganismos isolados em frutas, polpas e ambiente industrial. *Boletim CEPPA*, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 27-38.
- Tortora, G., Funke, B. e Case, C. (2000). *Microbiologia*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed.
- Tournas, V. e Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology* 105: 11-17.
- Tresseler, J., Figueiredo, E., Figueiredo R., Machado, T., Delfino, C. e Sousa, P. (2009). Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas. *Ciência e Agrotecnologia*. Vol. 33. Consultado a 14/08/2016. Disponível online em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542009000700004
- Uboldi Eiroa, M. (1989) Microrganismos deteriorantes de sucos de frutas e medidas de controle. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 3, p. 141-160.
- University of Guelph (2016). *Thermal Destruction of Microorganisms – Food Science*. Consultado a 14/07/2016. Disponível online em: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/thermal-destruction-microorganisms>
- USDA, (2012). *Introduction to the microbiology of food processing*. United States Department of Agriculture.
- Vaerewijck, M., De Vos, P., Lebbe, L., Scheldeman, P., Hote, B. e Heyndrickx, M. (2001). Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *Journal of Applied Microbiology*, n.91, p. 1074-1084.
- Vale, S. (2010). *Análise das atitudes e comportamentos dos jovens adultos face aos iogurtes: envolvimento, critérios de escolha e orientação para as marcas do distribuidor*. Dissertação para obtenção do grau em Mestre em Ciências da Comunicação. Universidade Fernando Pessoa, Porto. 123 p. Consultado a 20/07/2016. Disponível online em: http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/1384/2/dm_sandravale.pdf

- Valsechi, O. (2006). *Microbiologia dos Alimentos*. Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias. Consultado a 13/06/2016. Disponível online em: <http://www.cca.ufscar.br/~vico/Microbiologia%20dos%20Alimentos.pdf>
- Veiga, A., Lopes A., Carrilho E., Silva, L., Dias, M., Seabra, M., Borges, M., Fernandes, P., Nunes, S. e Ferreira, S. (2009). *Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal*. Lisboa, Ministério da economia e da Inovação. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
- Veloso, R. (2016). Frutos vermelhos: dicas da nutricionista para os produtores. Publicado na revista *Vida Rural* na edição de Outubro de 2015. Consultado a 1/09/2016. Disponível online em: <http://www.vidarural.pt/frutos-vermelhos/>
- Viegas, S. (2009). *Alterações do estado de saúde associadas à alimentação. Contaminação microbiológica dos alimentos*. Departamento da Alimentação e Nutrição. Instituto Nacional de Saúde.
- Walker, M. e Philips, C.A. (2008). The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. *Food Control* 19: 974-981.
- Walsh, R. e Martin, P. (1977). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator. *Journal of The Institute of Brewing*. 83:pp169-172. Consultado a 2/8/2016. Disponível online em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1977.tb06813.x/epdf>
- Wareing P. e Davenport R. (2007). *Microbiology of soft drinks and fruit juices. Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. Ashurst and Associates Consulting Chemists for the Food Industry Hereford. Segunda edição. pp: 279-299
- Weidenbörner, M., Wiczorek, C., Appel, S. e Kunz, B. (2000). Whole wheat and white wheat flour—the mycobiota and potential mycotoxins. *Food Microbiology*. 17:103–10
- Wikicommons*. Yeast Life Cycle. Multimedia. Consultado a 15/8/2016. Disponível online em: https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Yeast_life_cycle#/media/File:Budding_yeast_Lifecycle.png

Anexos

A- Caracterização microbiológica de matérias primas

Na tabela A1 encontram-se compilados os valores médios das leituras realizadas para as matérias primas avaliadas neste projeto – amora, framboesa, morango, farinha de aveia, farinha de cevada e farinha de trigo. Os valores resultam da média de 4 leituras realizadas, visto que cada matéria prima foi avaliada através de duas amostras e cada uma destas amostras foi avaliada em duplicado, segundo os procedimentos descritos na secção 3.4..

Tabela A1 – Compilação da média das leituras para cada tipo de microrganismo e amostra de matéria prima em UFC/g

	Contagens totais			Carga Esporulada			
	Mesófilos totais	Fungos filamentosos	Leveduras	Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias
Amora	208	9	<10	112	19	67	<10
Amora escolhida A	3467	371	5623	1071	<10	302	<10
Amora escolhida B	309	338	275	11	<10	245	<10

Tabela A1 (continuação) – Compilação da média das leituras para cada tipo de microrganismo e amostra de matéria prima em UFC/g

	Contagens totais			Carga Esporulada			
	Mesófilos totais	Fungos filamentosos	Leveduras	Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias
	Framboesa A	630	<10	1548	691	<10	933
Framboesa B	512	11	3388	478	<10	<10	<10
Framboesa C	173	<10	<10	3801	69	1819	<10
Framboesa D	1258	<10	15	79	22	316	<10
Framboesa E	257	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Morango A	2398	<10	<10	204	<10	141	<10
Morango B	58	<10	<10	56	10	60	<10

Tabela A1 (continuação) – Compilação da média das leituras para cada tipo de microrganismo e amostra de matéria prima em UFC/g

	Contagens totais			Carga Esporulada			
	Mesófilos totais	Fungos filamentosos	Leveduras	Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias
	Morango C	69	3	<10	549	<1	302
Farinha de cevada B	1513	54	416	32	19	14	<10
Farinha de cevada C	107	169	389	<10	<10	10,00	<10
Farinha de aveia A	3019	<10	<10	2238	43	1584	15
Farinha de aveia B	56	<10	<10	32	42	4	<10
Farinha de trigo sêmea grossa A	2884	<10	<10	31	<10	<10	<10

Tabela A1 (continuação) – Compilação da média das leituras para cada tipo de microrganismo e amostra de matéria prima em UFC/g

	Contagens totais			Carga Esporulada			
	Mesófilos totais	Fungos filamentosos	Leveduras	Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias
Farinha de trigo sêmea grossa B	1659	169	92	51	48	<10	<10
Farinha de trigo sêmea grossa C	3019	257	177	<10	<10	12	12

De modo a avaliar a existência de diferenças significativas entre as diferentes amostras da mesma matéria prima foram efetuados testes estatísticos: o teste “Anova fator único” e o “teste T: duas amostras com variâncias iguais” disponíveis para execução no suplemento de Análise de Dados do *Microsoft Office Excel*. Os resultados obtidos para as diferentes matérias primas encontram-se tabelados e agrupados entre a tabela A2 e a tabela A6.

O teste estatístico “Anova fator único” foi aplicado a todas as amostras da mesma matéria prima, se depois de aplicado o valor de p fosse inferior a 0,05 era realizado um novo teste estatístico, neste caso o “teste T: duas amostras com variâncias iguais” entre cada dois grupos de amostras de modo a avaliar entre quais existia a diferença estatisticamente significativas, se o valor de p fosse inferior a 0,0167 significava que existiam diferenças estatisticamente significativas entre as duas amostras testadas.

Tabela A2 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “Anova: fator único” entre grupos e do valor de p do “teste T: duas amostras com variâncias iguais” aplicado às amostras de amora escolhida, amora A e amora B

	Mesófilos Totais	Fungos Filamentosos	Leveduras	Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias
Entre os grupos	1,93E-01	2,50E-02	9,43E-07	4,70E-03	7,22E-07	8,57E-01	
Amora e Amora escolhida A		3,11E-02	1,05E-05	8,36E-02	5,84E-05		
Amora e Amora escolhida B		5,56E-02	1,60E-05	2,68E-02	5,84E-05		
Amora escolhida A e Amora escolhida B		9,04E-01	8,45E-03	6,10E-03	0,00E+00		

Tabela A3 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “Anova: fator único” entre grupos e do valor de p do “teste T: duas amostras com variâncias iguais” aplicado às amostras de framboesa A, framboesa B, framboesa C, framboesa D e framboesa E

	Mesófilos Totais	Fungos Filamentosos	Leveduras	Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias
Entre os grupos	1,47E-01	2,51E-01	2,79E-02	1,68E-05	3,46E-03	4,43E-02	7,02E-01
Framboesa A e Framboesa B			1,15E-01	7,84E-01	3,02E-01	1,58E-01	
Framboesa A e Framboesa C			1,85E-01	2,27E-02	2,73E-02	3,18E-01	
Framboesa A e Framboesa D			3,79E-01	2,12E-02	4,38E-01	6,67E-01	
Framboesa A e Framboesa E			6,77E-02	6,61E-04	3,32E-02	0,00E+00	
Framboesa B e Framboesa C			4,55E-03	1,24E-01	5,74E-03	1,33E-01	
Framboesa B e Framboesa D			6,41E-02	2,46E-01	1,31E-01	3,55E-01	

Tabela A3 (continuação) – Resultados estatísticos do valor de p do teste “Anova: fator único” entre grupos e do valor de p do “teste T: duas amostras com variâncias iguais” aplicado às amostras de framboesa A, framboesa B, framboesa C, framboesa D e framboesa E

	Mesófilos Totais	Fungos Filamentosos	Leveduras	Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias
Entre os grupos	1,47E-01	2,51E-01	2,79E-02	1,68E-05	3,46E-03	4,43E-02	7,02E-01
Framboesa B e Framboesa E			9,54E-04	1,14E-02	3,56E-01	4,23E-01	
Framboesa C e Framboesa D			8,75E-01	1,03E-05	3,23E-01	5,14E-01	
Framboesa C e Framboesa E			5,37E-01	5,17E-05	8,71E-08	4,52E-03	
Framboesa D e Framboesa E			5,74E-01	8,65E-03	2,44E-02	1,17E-01	

Tabela A4 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “Anova: fator único” entre grupos e do valor de p do “teste T: duas amostras com variâncias iguais” aplicado às amostras de morango A, morango B e morango C

	Mesófilos Totais	Fungos Filamentosos	Leveduras	Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias
Entre os grupos	1,61E-01	4,05E-01		1,00E-01	8,69E-03	6,10E-01	
Morango A e Morango B						1,20E-01	
Morango A e Morango C							
Morango B e Morango C						1,20E-01	

Tabela A5 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “Anova: fator único” entre grupos e do valor de p do “teste T: duas amostras com variâncias iguais” aplicado às amostras de farinha de trigo A, farinha de trigo B e farinha de trigo C

	Mesófilos Totais	Fungos Filamentosos	Leveduras	Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias
Entre os grupos	4,07E-01	2,15E-03	4,50E-03	4,03E-01	1,18E-03	1,66E-02	4,35E-03
Farinha de trigo A e Farinha de trigo B		1,31E-02	2,07E-02		5,95E-06	2,65E-02	
Farinha de trigo A e Farinha de trigo C		8,34E-03	6,17E-03		3,15E-02	1,78E-02	1,78E-02
Farinha de trigo B e Farinha de trigo C		2,17E-01	3,94E-01		1,08E-01	7,55E-01	1,78E-02

Tabela A6 – Resultados estatísticos do valor de *p* do teste “Anova: fator único” entre grupos de farinha de cevada e entre grupos de farinha de aveia e do valor de *p* do “teste T: duas amostras com variâncias iguais” aplicado às amostras de farinha de cevada A, farinha de cevada B e farinha de trigo C

	Mesófilos Totais	Fungos Filamentosos	Leveduras	Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias
Entre os grupos (Farinha de cevada)	2,53E-04	6,53E-01	4,38E-03	2,42E-04	3,18E-01	9,18E-02	
Farinha de cevada A e Farinha de cevada B	1,18E-02		9,78E-03	4,91E-04			
Farinha de cevada A e Farinha de cevada C	9,29E-06		9,45E-03	9,91E-04			
Farinha de cevada B e Farinha de cevada C	6,81E-02		9,22E-01	3,20E-02			
Entre grupos (Farinha de aveia)	3,16E-05	3,56E-01		2,30E-04	9,30E-01	5,94E-02	8,64E-01

B- Caracterização da etapa de ingredientação

Na fase de caracterização da etapa de ingredientação foram aplicados os mesmos testes estatísticos previamente utilizados para as matérias primas. Nesta fase os testes estatísticos pretendem verificar se existem diferenças estatisticamente significativas na carga microbiana dos preparados de amora, framboesa e cereais quando estes estão expostos a binómios tempo-temperatura de ingredientação com tempos e temperaturas diferentes. Os resultados obtidos para os diferentes binómios tempo-temperatura estão agrupados por preparado nas tabelas B1, B4 e B7.

Nas tabelas B2, B3, B5, B6 e B8 encontra-se compilados as médias dos resultados das 4 contagens de carga microbiana efetuadas aos preparados de amora de baixo °Brix, amora de elevado °Brix, framboesa de baixo °Brix, framboesa de elevado °Brix e ao preparado de cereais, respetivamente, em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio tempo-temperatura de ingredientação aplicado.

Tabela B1 – Resultados estatísticos do valor de p do teste “*Anova*: fator único” entre a matéria prima e os binómios tempo-temperatura de ingredientação aplicados e entre binómios tempo-temperatura de ingredientação para o preparado de framboesa de baixo °Brix e elevado °Brix

		Mesófilos totais	Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias
Baixo °Brix	MP e binómios tempo- temperatura de ingredientação	1,16E-05	1,07E-03
	Binómios tempo- temperatura de ingredientação	5,11E-02	7,33E-01
Elevado °Brix	MP e binómios tempo- temperatura de ingredientação	2,64-07	7,91E-03
	Binómios tempo- temperatura de ingredientação	6,76E-01	

Tabela B2 – Resultados da média das 4 leituras efetuadas para o preparado de amora de baixo °Brix em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio tempo-temperatura de ingredientação aplicado

	Matéria prima	2 h, 35 °C	3 h, 35 °C	4 h, 35 °C	3 h, 50 °C	4 h, 50 °C
Mesófilos totais	3485	21	51	25	18	42
Fungos filamentosos	375	<10	<10	<10	<10	<10
Leveduras	5561	<10	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	1062	15	<10	18	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	300	<10	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Tabela B3 – Resultados da média das 4 leituras efetuadas para o preparado de amora de elevado °Brix em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio tempo-temperatura de ingredientação aplicado

	Matéria prima	2 h, 35 °C	3 h, 35 °C	4 h, 35 °C	3 h, 50 °C	4 h, 50 °C
Mesófilos totais	3485	42	45	66	58	62
Fungos filamentosos	375	<10	<10	<10	<10	<10
Leveduras	5561	<10	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	1062	15	<10	18	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Tabela B3 (continuação) – Resultados da média das 4 leituras efetuadas para o preparado de amora de elevado °Brix em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio tempo-temperatura de ingredientação aplicado

	Matéria prima	2 h, 35 °C	3 h, 35 °C	4 h, 35 °C	3 h, 50 °C	4 h, 50 °C
Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	300	<10	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Tabela B4 – Resultados estatísticos do valor de *p* do teste “Anova: fator único” entre a matéria prima e os binómios tempo-temperatura de ingredientação aplicados e entre binómios de ingredientação para o preparado de framboesa de baixo °Brix e elevado °Brix

	Mesófilos totais	Leveduras	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias
MP e binómios tempo-temperatura de ingredientação	6,77E-06	7,26E-04	6,97E-03
Binómios tempo-temperatura de ingredientação	2,91E-04	1,66E-10	2,77E-01
Baixo °Brix Binómios tempo-temperatura de ingredientação (exceto 2 h, 35 °C)	1,20E-01		
MP e binómio tempo-temperatura de ingredientação que apresenta carga		1,61E-01	2,67E-01

Tabela B4 (continuação) – Resultados estatísticos do valor de *p* do teste “Anova: fator único” entre a matéria prima e os binómios tempo-temperatura de ingredientação aplicados e entre binómios tempo-temperatura de ingredientação para o preparado de framboesa de baixo °Brix e elevado °Brix

	Mesófilos totais	Bactérias formadoras de esporos mesófilas	
		Leveduras aeróbias	Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias
Alto °Brix	MP e binómios de tempo-temperatura de ingredientação	4,82E-03	1,14E-04
°Brix	Binómios de tempo-temperatura de ingredientação	5,51E-01	2,45E-03

Tabela B5 – Resultados da média das 4 leituras efetuadas para o preparado de framboesa de baixo °Brix em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio de tempo-temperatura de ingredientação aplicado

	Matéria Prima	2 h, 35 °C	3 h, 50 °C	3 h, 40 °C	6 h, 40 °C
Mesófilos totais	1259	347	21	63	26
Fungos filamentosos	<10	<10	<10	<10	<10
Leveduras	15	1738	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	79	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	22	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	316	<10	<10	<10	16
Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias	<10	<10	<10	<10	<10

Tabela B6 – Resultados da média das 4 leituras efetuadas para o preparado de framboesa de elevado °Brix em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio de tempo-temperatura de ingredientação aplicado

	Matéria prima	2 h, 35 °C	1 h, 40 °C	3 h, 50 °C	1 h, 60 °C
Mesófilos totais	1258	<10	14	46	<10
Fungos filamentosos	<10	<10	<10	<10	<10
Leveduras	15,14	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	79	16	<10	<10	16
Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	22	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	316	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias	<10	<10	<10	<10	<10

Tabela B7 – Resultados estatísticos do valor de *p* do teste “Anova: fator único” entre a matéria prima e os binómios tempo-temperatura de ingredientação aplicados e entre binómios tempo-temperatura de ingredientação para o preparado de cereais

	Mesófilos totais	Fungos filamentosos	Leveduras
Matéria prima e binómios tempo-temperatura de ingredientação	2,67E-02	3,65E-02	9,98E-06
Binómios tempo-temperatura de ingredientação	1,42E-02	2,85E-02	2,09E-05

Tabela B8 – Resultados da média das 4 leituras efetuadas para o preparado de cereais em termos de mesófilos totais, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos em UFC/g, após o binómio de tempo-temperatura de ingredientação aplicado

	1 h, 20 °C	3 h, 20 °C	2 h, 40 °C	3 h, 40 °C
Mesófilos totais	794	575	213	104
Fungos filamentosos	91	<10	<10	<10
Leveduras	446	933	239	128
Bactérias formadoras de esporos mesófilas aeróbias	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos termófilas aeróbias	14	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos mesófilas anaeróbias	<10	<10	<10	<10
Bactérias formadoras de esporos termófilas anaeróbias	<10	<10	<10	<10

C- Determinação dos parâmetros de cinética de inativação térmica

Para determinar os parâmetros de pasteurização dos microrganismos alvo deste projeto foi necessário elaborar um gráfico do logaritmo da concentração de cada microrganismo ao longo do tempo de pasteurização. Neste gráfico era traçada uma reta de regressão linear recorrendo às ferramentas do *Microsoft Office Excel*. Com a equação da reta foi possível substituir o y por dois valores com diferença de um logaritmo por onde aquela reta passava e determinar o x. A diferença dos dois valores de x – que representava o tempo em minutos – determinava o resultado de D para a temperatura do binómio aplicado.

Depois de obter o valor de D para os diferentes binómios de pasteurização, foi elaborado um gráfico do logaritmo dos valores de D em função da temperatura. Novamente, foi traçada uma reta de regressão linear e com a equação da reta foi possível determinar dois valores de x – que neste caso representavam a temperatura em °C. A diferença entre os dois valores de x, determinava o valor de z para o microrganismo alvo.

A equação da reta é acompanhada pelo valor do coeficiente de determinação R^2 que representa o quão ajustados à reta estão os valores e o valor de D e de z estão acompanhados pelo desvio padrão por terem sido calculados para dois ensaios.

Os valores mencionados encontram-se agrupados por microrganismo e por preparado. Nas tabelas C1 e C2 encontram-se compilados os valores para *Bacillus* sp. no preparado de framboesa de baixo °Brix. Nas tabelas C3 e C4 encontram-se os valores para *Bacillus* sp. no preparado de framboesa de elevado °Brix. Nas tabelas C5 e C6 encontram-se representados os valores para *T. vulgaris/intermedius* no preparado de framboesa de baixo °Brix. Nas tabelas C7 e C8 encontram-se representados os valores para *T. vulgaris/intermedius* no preparado de framboesa de elevado °Brix. Os valores de *Bacillus* sp. no preparado de cereais encontram-se nas tabelas C9 e C10 e os valores de *B. smithii* nas tabelas C11 e C12.

Tabela C1 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus* sp. no preparado de framboesa de baixo °Brix, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais

Preparado de framboesa de baixo °Brix	D (min)	R ²	Equação da Reta	Desvio padrão	
2 h, 35 °C	85 °C, 5 min	5,62	0,34	$y = - 0,18 x + 4,85$	0,45
	85 °C, 5 min	6,25	0,43	$y = - 0,16 x + 4,78$	
3 h, 50 °C	85 °C, 5 min	4,66	0,73	$y = - 0,22 x + 5,16$	1,43
	85 °C, 5 min	6,68	0,84	$y = - 0,15 x + 4,41$	
2 h, 35 °C	90 °C, 4 min	1,45	0,59	$y = - 0,69 x + 5,23$	0,04
	90 °C, 4 min	1,39	0,73	$y = - 0,72 x + 5,54$	
3 h, 50 °C	90 °C, 4 min	2,21	0,56	$y = - 0,45 x + 4,89$	0,26
	90 °C, 4 min	1,84	0,64	$y = - 0,55 x + 5,03$	
2 h, 35 °C	95 °C, 5 min	0,85	1,00	$y = - 1,18 x + 4,05$	0,44
	95 °C, 5 min	1,48	0,89	$y = - 0,68 x + 3,96$	
3 h, 50 °C	95 °C, 5 min	1,92	0,75	$y = - 0,52 x + 3,09$	0,00
	95 °C, 5 min	1,92	1,00	$y = - 0,52 x + 3,25$	

Tabela C2 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus* sp. no preparado de framboesa de baixo °Brix, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais

	lg de D			Equação da reta	R ²	z (°C)	Desvio padrão	Média
	85 °C 5 min	90 °C 4 min	95 °C 5 min					
1º ensaio 2 h, 35 °C	0,75	0,16	-0,07	$y = - 0,08 x + 7,66$	0,94	12,20	2,60	14,03
2º ensaio 2 h, 35 °C	0,80	0,14	0,17	$y = - 0,06 x + 6,04$	0,71	15,87		
1º ensaio 3 h, 50 °C	0,67	0,34	0,28	$y = - 0,04 x + 3,94$	0,86	25,64	5,04	22,08
2º ensaio 3 h, 50 °C	0,82	0,26	0,28	$y = - 0,05 x + 5,31$	0,72	18,52		

Tabela C3 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus* sp. no preparado de framboesa de elevado °Brix, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais

Preparado de framboesa de elevado °Brix		D (min)	R ²	Equação da Reta	Desvio padrão
2 h, 35 °C	85 °C, 5 min	4,52	0,86	$y = - 0,22 x + 4,01$	0,54
	85 °C, 5 min	3,76	1,00	$y = - 0,27 x + 4,35$	
3 h, 50 °C	85 °C, 5 min	4,71	0,83	$y = - 0,21 x + 5,36$	0,08
	85 °C, 5 min	4,83	0,99	$y = - 0,21 x + 5,16$	

Tabela C3 (continuação) – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus* sp. no preparado de framboesa de elevado °Brix, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais

Preparado de framboesa de elevado °Brix		D (min)	R ²	Equação da Reta	Desvio padrão
2 h, 35 °C	90 °C, 4 min	2,67	0,88	$y = - 0,37 x + 5,03$	0,54
	90 °C, 4 min	3,43	0,83	$y = - 0,29 x + 5,02$	
3 h, 50 °C	90 °C, 4 min	3,40	0,72	$y = - 0,29 x + 4,73$	0,54
	90 °C, 4 min	4,16	0,83	$y = - 0,24 x + 4,58$	
2 h, 35 °C	95 °C, 5 min	2,30	0,98	$y = - 0,44 x + 3,52$	0,65
	95 °C, 5 min	1,37	0,95	$y = - 0,73 x + 4,43$	
3 h, 50 °C	95 °C, 5 min	3,24	0,91	$y = - 0,31 x + 4,85$	0,33
	95 °C, 5 min	2,77	0,82	$y = - 0,36 x + 4,87$	

Tabela C4 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus* sp. no preparado de framboesa de elevado °Brix, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais

	lg de D			Equação da reta	R ²	z (°C)	Desvio padrão	Média
	85 °C 5 min	90 °C 4 min	95 °C 5 min					
1º ensaio 2 h, 35 °C	0,66	0,43	0,14	$y = - 0,02 x + 2,49$	0,72	45,45	0,00	45,45
2º ensaio 2 h, 35 °C	0,58	0,54	0,36	$y = - 0,02 x + 2,47$	0,88	45,45		

Tabela C4 (continuação – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus* sp. no preparado de framboesa de elevado °Brix, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais

	lg de D			Equação da reta	R ²	z (°C)	Desvio padrão	Média
	85 °C 5 min	90 °C 4 min	95 °C 5 min					
1° ensaio								
3 h, 50 °C	0,67	0,53	0,44	$y = - 0,02 x + 2,62$	0,98	34,70		
2° ensaio							17,06	46,76
3 h, 50 °C	0,68	0,62	0,51	$y = - 0,02 x + 2,13$	0,97	58,82		

Tabela C5 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *T. vulgaris/intermedius* no preparado de framboesa de baixo °Brix, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais

Preparado de framboesa de baixo ° Brix	D (min)	R ²	Equação da Reta	Desvio padrão	
2 h, 35 °C	85 °C, 5 min	13,00	0,21	$y = - 0,08 x + 2,34$	0,77
	85 °C, 5 min	11,92	0,18	$y = - 0,08 x + 2,14$	
3 h, 50 °C	85 °C, 5 min	8,56	0,33	$y = - 0,12 x + 2,73$	3,04
	85 °C, 5 min	4,26	0,73	$y = - 0,23 x + 3,13$	

Tabela C5 (continuação) – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *T. vulgaris/intermedius* no preparado de framboesa de baixo °Brix, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais

Preparado de framboesa de baixo °Brix		D (min)	R ²	Equação da Reta	Desvio padrão
2 h, 35 °C	90 °C, 4 min	3,41	0,97	$y = - 0,29 x + 2,86$	0,26
	90 °C, 4 min	3,04	0,95	$y = - 0,33 x + 2,84$	
3 h, 50 °C	90 °C, 4 min	8,48	0,92	$y = - 0,11 x + 2,46$	4,76
	90 °C, 4 min	1,74	0,99	$y = - 0,57 x + 4,36$	
2 h, 35 °C	95 °C, 5 min	1,61	0,94	$y = - 0,62 x + 4,16$	0,11
	95 °C, 5 min	1,46	0,75	$y = - 0,69 x + 4,27$	
3 h, 50 °C	95 °C, 5 min	4,14	0,64	$y = - 0,24 x + 3,78$	0,64
	95 °C, 5 min	3,23	0,72	$y = - 0,31 x + 3,70$	

Tabela C6 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *T. vulgaris/ intermedius* no preparado de framboesa de baixo °Brix, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais

	lg de D			Equação da reta	R ²	z (°C)	Desvio padrão	Média
	85 °C	90 °C	95 °C					
	5 min	4 min	5 min					
1º ensaio 2 h, 35 °C	1,11	0,53	0,21	$y = - 0,09 x + 8,72$	0,93	11,11	0,17	10,99
2º ensaio 2 h, 35 °C	1,08	0,48	0,16	$y = - 0,09 x + 8,85$	0,97	10,87		
1º ensaio 3 h, 50 °C	0,93	0,93	0,62	$y = - 0,03 x + 3,62$	0,75	32,26	36,12	57,80
2º ensaio 3 h, 50 °C	0,63	0,24	0,51	$y = - 0,01 x + 1,54$	0,09	83,33		

Tabela C7 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *T. vulgaris/intermedius* no preparado de framboesa de elevado °Brix, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais.

Preparado de framboesa de alto °Brix	D (min)	R ²	Equação da Reta	Desvio padrão
85 °C, 5 min	97,09	0,08	$y = - 0,01 x + 3,27$	59,35
2 h, 35 °C	13,16	0,07	$y = - 0,08 x + 3,33$	
85 °C, 5 min	2,69	0,51	$y = - 0,37 x + 4,68$	2,51
3 h, 50 °C	6,25	0,70	$y = - 0,16 x + 4,16$	

Tabela C7 (continuação) – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *T. vulgaris/intermedius* no preparado de framboesa de elevado °Brix, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais

Preparado de framboesa de alto °Brix		D (min)	R ²	Equação da Reta	Desvio padrão
2 h, 35 °C	90 °C, 4 min	32,15	0,42	$y = - 0,03 x + 3,46$	20,18
	90 °C, 4 min	3,62	0,93	$y = - 0,28 x + 3,64$	
3 h, 50 °C	90 °C, 4 min	2,49	0,98	$y = - 0,40 x + 4,25$	2,87
	90 °C, 4 min	6,56	0,95	$y = - 0,15 x + 4,01$	
2 h, 35 °C	95 °C, 5 min	1,33	0,84	$y = - 0,75 x + 4,33$	0,24
	95 °C, 5 min	1,67	0,88	$y = - 0,60 x + 4,32$	
3 h, 50 °C	95 °C, 5 min	1,89	0,86	$y = - 0,53 x + 3,79$	1,08
	95 °C, 5 min	3,41	0,83	$y = - 0,29 x + 3,56$	

Tabela C8 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *T. vulgaris/intermedius* no preparado de framboesa de elevado °Brix, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais

	lg de D			Equação da reta	R ²	z (°C)	Desvio padrão	Média
	85 °C 5 min	90 °C 4 min	95 °C 5 min					
1º ensaio 2 h, 35 °C	1,99	1,51	0,22	$y = - 0,18 x + 17,14$	0,96	5,65	3,08	7,82
2º ensaio 2 h, 35 °C	1,12	0,56	0,12	$y = - 0,10 x + 9,60$	1,00	10,00		
1º ensaio 3 h, 50 °C	0,80	0,82	0,53	$y = - 0,03 x + 3,15$	0,69	37,04	20,95	51,85
2º ensaio 3 h, 50 °C	0,43	0,40	0,28	$y = - 0,02 x + 1,72$	0,89	66,67		

Tabela C9 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus* sp. no preparado de framboesa de cereais, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais

Preparado de cereais	D (min)	R ²	Equação da Reta	Desvio padrão	
3 h, 40 °C	85 °C, 5 min	7,43	0,21	$y = 0,13 x + 3,63$	3,49
	85 °C, 5 min	2,50	0,90	$y = - 0,40 x + 5,14$	
1 h, 50 °C	85 °C, 5 min	4,20	0,31	$y = - 0,24 x + 4,18$	0,28
	85 °C, 5 min	3,81	0,76	$y = - 0,26 x + 5,40$	

Tabela C9 (continuação) – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus* sp. no preparado de framboesa de cereais, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais

Preparado de cereais		D (min)	R ²	Equação da Reta	Desvio padrão
3 h, 40 °C	90 °C, 4 min	2,37	1,00	$y = - 0,42 x + 3,97$	0,49
	90 °C, 4 min	1,67	0,93	$y = - 0,60 x + 4,14$	
1 h, 50 °C	90 °C, 4 min	2,57	0,40	$y = - 0,39 x + 4,98$	0,42
	90 °C, 4 min	1,98	0,74	$y = - 0,50 x + 5,15$	

Tabela C10 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *Bacillus* sp. no preparado de cereais, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais

	lg de D		Equação da reta	R ²	z (°C)	Desvio padrão	Média
	85 °C 5 min	90 °C 4 min					
1º ensaio 1 h, 50 °C	0,62	0,41	$y = - 0,04 x + 4,24$	1,00	23,47	4,19	20,51
2º ensaio 1 h, 50 °C	0,58	0,30	$y = - 0,06 x + 5,42$	1,00	17,54		
1º ensaio 3 h, 40 °C	0,87	0,37	$y = - 0,10 x + 9,32$	1,00	10,07	12,91	19,20
2º ensaio 3 h, 40 °C	0,40	0,22	$y = - 0,04 x + 3,40$	1,00	28,33		

Tabela C11 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de D para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *B. smithii* no preparado de framboesa de cereais, equação da reta, R² associado e o desvio padrão do valor de D entre os dois ensaios laboratoriais

Preparado de cereais		D (min)	R ²	Equação da Reta	Desvio padrão
1 h, 50 °C	85 °C, 5 min	3,64	0,34	$y = - 0,26 x + 2,21$	1,37
	85 °C, 5 min	1,70	0,99	$y = - 0,59 x + 1,80$	
1 h, 50 °C	90 °C, 4 min	1,60	0,88	$y = - 0,62 x + 2,52$	0,42
	90 °C, 4 min	1,01	0,93	$y = - 0,99 x + 4,29$	
1 h, 50 °C	95 °C, 5 min	1,42	0,96	$y = - 0,70 x + 2,63$	0,33
	95 °C, 5 min	0,96	0,97	$y = - 1,04 x + 3,00$	

Tabela C12 – Cálculos intermédios para a determinação do valor de z para cada binómio tempo-temperatura de pasteurização de cada ensaio laboratorial com o microrganismo *B. smithii* no preparado de cereais, equação da reta, R² associado, o desvio padrão e a média do valor de z entre os dois ensaios laboratoriais

	lg de D			Equação da reta	R ²	z (°C)	Desvio padrão	Média
	85 °C 5 min	90 °C 4 min	95 °C 5 min					
1º ensaio 1 h, 50 °C	0,56	0,20	0,15	$y = - 0,04 x + 3,99$	0,84	24,39	11,04	32,20
2º ensaio 1 h, 50 °C	0,23	0,00	-0,02	$y = - 0,03 x + 2,32$	0,81	40,00		