



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Mariana Sofia Oliveira Costa

Pesquisa de técnicas alternativas para análises de rotina de controlo de qualidade na Imperial: teste e viabilidade de aplicação

Pesquisa de técnicas alternativas para análises de rotina de controlo de qualidade na Imperial

Mariana Sofia Oliveira Costa

UMinho | 2021



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Mariana Sofia Oliveira Costa

**Pesquisa de técnicas alternativas para
análises de rotina de controlo de qualidade
na Imperial: teste e viabilidade de aplicação**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob orientação do

Professor Doutor José António Couto Teixeira

e da

Engenheira Raquel dos Santos Amorim

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial
CC BY-NC

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Imperial – Produtos Alimentares, S.A. pela oportunidade de estágio curricular concedida. Agradeço a todos os colaboradores com quem interagi durante estes seis meses de estágio, que de alguma forma me ajudaram, ensinaram e motivaram. Devo um agradecimento especial à Eng^a Sofia Vieira da Silva pela oportunidade que me deu e que me permitiu aumentar a minha experiência profissional e agradeço à minha orientadora, a Eng^a Raquel Amorim, pelo tempo e apoio demonstrados, o que permitiu complementar e enriquecer esta tese de dissertação. Mais ainda, agradeço à Ana Lúcia Reis, Mariana Peneda Cubal e Patrícia Macedo pela forma acolhedora como me receberam e à Mafalda Moreira por toda a ajuda e paciência que teve comigo.

Em segundo lugar, agradeço à Universidade do Minho por me ter proporcionado este estágio curricular que me fez crescer tanto profissionalmente, como pessoalmente. Ao Prof. José António Teixeira agradeço todo o tempo que dedicou a esclarecer as minhas dúvidas e por todos os conselhos que deu para que eu pudesse realizar o melhor trabalho possível. Agradeço também à minha companheira de viagens e colega de curso, Joana Lisboa Gomes, pela ajuda e paciência nos momentos mais difíceis.

Por último, mas não menos importante, devo um especial agradecimento à minha família, em particular à minha mãe e ao meu pai, por todo o apoio dado e por me terem dado todas as condições possíveis para que eu realizasse este estágio curricular, tão longe de casa. Aos meus amigos, agradeço a compreensão pela ausência muitas vezes sentida e por sempre acreditarem em mim.

Declaração de integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Pesquisa de técnicas alternativas para as análises de rotina do controlo de qualidade da Imperial: teste e viabilidade de aplicação

Resumo

Esta dissertação foi realizada durante o estágio curricular na empresa Imperial – Produtos Alimentares, S.A., no âmbito do último ano do Mestrado Integrado em Engenharia Biológica e teve como principal objetivo a pesquisa de técnicas alternativas para a realização de análises de rotina de controlo de qualidade na Imperial. Atualmente, a empresa realiza análises microbiológicas (contagem total de microrganismos, contagem de bolores e leveduras, e pesquisa de bactérias coliformes), análises físico-químicas (determinação do teor de gordura e humidade), análises químicas (micotoxinas) e análises nutricionais (presença de alérgenos e açúcares).

Em relação às análises microbiológicas, foi realizada uma atualização de procedimentos e uma consequente avaliação dos custos dos diferentes meios de cultura existentes no mercado. Uma vez que a preparação dos meios de cultura é um procedimento muito demorado, foi proposta como alternativa a utilização de meios de cultura prontos a usar que, no entanto, apresentam um custo elevado.

Quanto às análises físico-químicas, verificou-se que, quer o método de determinação de humidade, quer o método de determinação de gordura são procedimentos demorados. Como alternativa, foram propostos equipamentos automáticos, que apresentam os resultados mais rapidamente, embora com custos de investimento inicial muito elevados. Para além disso, propôs-se um método adicional de determinação do teor de ácidos gordos livres, usado para avaliar a manteiga de cacau, que consequentemente afeta a qualidade do chocolate.

Relativamente às análises químicas de determinação de micotoxinas, estas são realizadas em laboratórios externos, através do método HPLC, pelo que o tempo de obtenção de resultados é demorado. Existem no mercado *kits* rápidos de deteção de micotoxinas, que foram propostos como alternativa.

Finalmente, em relação às análises nutricionais, a Imperial recorre também a laboratórios externos para realizar a determinação de alérgenos e açúcares em alguns dos seus produtos. No caso dos alérgenos, os métodos ELISA ou PCR utilizados são caros e demorados, o que faz com que a alternativa proposta de utilização de *kits* rápidos seja muito vantajosa. No caso dos açúcares, como a sacarose, a D-glicose e a D-frutose, o método HPLC utilizado também é muito demorado e uma das poucas alternativas existentes é a utilização de um dispositivo automático e um detetor RFID, que apesar de caro, determina a quantidade de açúcares muito mais rapidamente.

Palavras-chave: controlo de qualidade; pesquisa de alternativas; teste e viabilidade.

Alternative techniques research for routine quality control analysis at Imperial: test and feasibility of application

Abstract

This dissertation was carried out during the curricular internship at the company Imperial – Produtos Alimentares, SA, within the last year of the Integrated Master in Biological Engineering and had as its main objective the research of alternative techniques for carrying out routine quality control analyses in Imperial. Currently, the company performs microbiological analyzes (total microorganism count, mold and yeast count, and research for coliform bacteria), physicochemical analyzes (determination of fat and moisture content), chemical analyzes (mycotoxins) and nutritional analyzes (presence of allergens and sugars).

Regarding microbiological analyses, an update of procedures was carried out and a consequent evaluation of the costs of the different culture media on the market was carried out. Since the preparation of culture media is a very time-consuming procedure, it was proposed as an alternative the use of ready-to-use culture media, which, however, have a high cost.

As for the physicochemical analyses, it was found that both the moisture determination method and the fat determination method are time-consuming procedures. As an alternative, automatic equipment has been proposed, which show results more quickly, although with very high initial investment costs. Furthermore, an additional method of determining the free fatty acid content was proposed, used to evaluate cocoa butter, which consequently affects the quality of chocolate.

Regarding chemical analyzes for the determination of mycotoxins, these are carried out in external laboratories, using the HPLC method, which means that the time taken to obtain results is lengthy. There are quick mycotoxin detection *kits* on the market, which have been proposed as an alternative.

Finally, in relation to nutritional analyses, Imperial also uses external laboratories to carry out the determination of allergens and sugars in some of its products. In the case of allergens, the ELISA or PCR methods used are expensive and time-consuming, which makes the proposed alternative of using rapid *kits* very advantageous. In the case of sugars, such as sucrose, D-glucose, and D-fructose, the HPLC method used is also very time-consuming and one of the few alternatives available is the use of an automatic device and an RFID detector, which, despite being expensive, determines the amount of sugar much more quickly.

Keywords: quality control; alternative research; testing and feasibility.

Índice

Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	x
Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas	xi
Capítulo 1. Introdução	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Objetivos	1
1.3. A empresa: Imperial	2
1.4. Metodologia de investigação	4
1.5. Estrutura da dissertação	4
Capítulo 2. Revisão bibliográfica	6
2.1. A História do chocolate	6
2.2. Processo de produção de chocolate	8
2.2.1. Transformação dos grãos de cacau	9
2.2.2. Produção de pasta de cacau, manteiga de cacau e cacau em pó	11
2.2.3. Produção de chocolate	14
2.3. Controlo de qualidade na produção de chocolate	20
2.3.1. Importância do controlo de qualidade	20
2.3.2. Procedimentos usados no controlo de qualidade na produção de chocolate	23
2.3.2.1. Avaliação das matérias-primas e dos materiais de embalagem	23
2.3.2.2. Controlo do processo de fabrico	24
2.3.2.3. Inspeção do produto acabado	26
Capítulo 3. Pesquisa de técnicas alternativas às análises de rotina	28
3.1 Análises de rotina: situação atual	28
3.1.1. Análises microbiológicas	28
3.1.1.1. Contagem total de microrganismos	28
3.1.1.2. Contagem de bolores e leveduras	30
3.1.1.3. Pesquisa de bactérias coliformes	31
3.1.1.4. Contagem de E. coli, pesquisa de Salmonella e outras análises	32
3.1.2. Análises físico-químicas	32
3.1.2.1. Determinação do teor de gordura	32
3.1.2.2. Determinação do teor de humidade	34
3.1.3. Análises químicas e nutricionais	35
3.1.3.1. Determinação de micotoxinas	35
3.1.3.2. Determinação de alergénios	37

3.1.3.3. Determinação de açúcares.....	39
3.2. Propostas alternativas às análises de rotina	39
3.2.1. Alternativas propostas: análises microbiológicas	39
3.2.1.1. Técnica de espalhamento da superfície	39
3.2.1.2. Placas Compact Dry	41
3.2.2. Alternativas propostas: determinação do teor de gordura	42
3.2.2.1. Equipamento de Soxhlet automático.....	42
3.2.2.2. Determinação do teor de ácidos gordos livres.....	43
3.2.3. Alternativa proposta: determinação do teor de humidade	46
3.2.3.1. Analisador de humidade automático.....	46
3.2.4. Alternativas propostas: análises químicas e nutricionais.....	46
3.2.4.1. <i>Kits</i> rápidos para deteção de micotoxinas.....	46
3.2.4.2. <i>Kits</i> rápidos para deteção de alergénios	47
3.2.4.3. Dispositivo automático de determinação de açúcares	48
Capítulo 4: Teste e viabilidade das alternativas propostas.....	50
4.1. Teste e viabilidade: análises microbiológicas.....	50
4.1.1. Teste e viabilidade da técnica de espalhamento da superfície	50
4.1.2. Teste e viabilidade das placas Compact Dry	53
4.2. Teste e viabilidade: determinação do teor de gordura.....	55
4.2.1. Viabilidade do equipamento de Soxhlet automático	55
4.2.2. Teste e viabilidade do método de determinação do teor de ácidos gordos livres	56
4.3. Teste e viabilidade: determinação do teor de humidade	57
4.3.1. Viabilidade do analisador de humidade automático.....	57
4.4. Teste e viabilidade: análises químicas e nutricionais	59
4.4.1. Viabilidade dos <i>kits</i> rápidos para deteção de micotoxinas.....	59
4.4.2. Teste e viabilidade dos <i>kits</i> rápidos para deteção de alergénios.....	59
4.4.3. Viabilidade do dispositivo automático de determinação de açúcares.....	60
Capítulo 5. Considerações finais e recomendações futuras.....	62
Referências bibliográficas	64
Anexos	68
Anexo I – Custos associados aos diferentes meios de cultura DG18 existentes no mercado	68
Anexo II – Suporte fotográfico: comparação entre a técnica de incorporação e a técnica de espalhamento para contagem de bolores e leveduras	71
Anexo III – Suporte fotográfico: comparação entre a técnica de incorporação e as placas Compact Dry para contagem total de microrganismos	72
Anexo IV – Custos associados à preparação manual das placas de Petri com meio de cultura	73

Anexo V – Custos associados à utilização das placas Compact Dry e respetivas normas para a contagem de <i>E. coli</i> e pesquisa de <i>Salmonella</i>	75
Anexo VI – Custos associados ao método de Soxhlet tradicional e ao equipamento de Soxhlet automático.....	77
Anexo VII – Custos associados ao método de determinação do teor de ácidos gordos livres.....	79
Anexo VIII – Custos associados ao método de secagem por estufa e ao analisador de humidade automático.....	81

Índice de figuras

Figura 1 - Exemplos de marcas Imperial: Pintarolas, Regina e Pantagruel (Adaptado de Imperial, 2021).	4
Figura 2 - Fluxograma do processo de produção de chocolate.	9
Figura 3 - Grãos de cacau no fruto ou vagem (Cook, 2021).	10
Figura 4 - Separação das cascas dos grãos de cacau, formando os nibs (Adaptado de Frangioni, 2016).	12
Figura 5 - Prensa de cacau de 12 potes (Machine Sale, 2020).	13
Figura 6 - Estrutura de um triglicerídeo (Adaptado de Dand, 2011b).	14
Figura 7 - Equipamento refinador de cinco cilindros (ExportersIndia.com, 2021).	15
Figura 8 - Diagrama de funcionamento do refinador (Adaptado de Cocoa & Chocolate online, 2021).	15
Figura 9 - Equipamento "concha" (Indiamart, 2021).	16
Figura 10 - Sequência de temperagem, durante a cristalização do chocolate (Adaptado de Beckett, 2009).	17
Figura 11 - Equipamento de moldação para tabletes de chocolate (Directindustry, 2021).	18
Figura 12 - Equipamento de revestimento em operação (Potrowl, 2019).	19
Figura 13 - Equipamento utilizado para drageados.	20
Figura 14 - Etapas e princípios da metodologia HACCP.	22
Figura 15 - Etapas genéricas do método de contagem total de microrganismos.	28
Figura 16 - Etapas genéricas do método de pesquisa de bactérias coliformes.	31
Figura 17 - Etapas genéricas do método de determinação do teor de gordura.	32
Figura 18 - Equipamento de Soxhlet montado, durante a extração.	33
Figura 19 - Etapas genéricas do método de determinação do teor de humidade.	34
Figura 20 - Representação esquemática de um HPLC, onde: (a) compartimento do solvente; (b) bomba; (c) porta de injeção da amostra; (d) coluna; (e) detetor; (f) registo e processamento de dados e (g) desperdício (Gika et al., 2015).	36
Figura 21 - Diferença entre os diferentes métodos ELISA disponíveis (Adaptado de HHUB, 2021).	37
Figura 22 - Etapas do método PCR.	38
Figura 23 - Etapas genéricas do método atualizado de contagem de bolores e leveduras.	40
Figura 24 - Etapas do procedimento de utilização de uma placa Compact.	42
Figura 25 - Etapas do processo de extração com o equipamento de Soxhlet automático (Adaptado de Gerhardt, 2021).	43
Figura 26 – Material necessário para realizar uma titulação.	45
Figura 27 - Equipamento analisador de humidade automático (Mettler Toledo, 2021).	46
Figura 28 - Etapas do processo de determinação de alergénios com os kits rápidos.	48
Figura 29 - Etapas do processo de determinação de açúcares, utilizando um dispositivo automático e um detetor RFID (Adaptado de R-Biopharm, 2021b).	49

Índice de tabelas

Tabela 1 - Exemplos de formulações para diferentes tipos de chocolate (g/100g) (Caligiani et al., 2016)	15
Tabela 2 - Métodos de avaliação necessário para cada tipo de matéria-prima	24
Tabela 3 - Parâmetros a controlar em cada etapa do processo de produção de chocolate	25
Tabela 4 - Massas da porção de teste e concentrações alcalinas (NaOH ou KOH) (International Organization for Standardization, 2020)	44
Tabela 5 - Escolha do tipo de ácido gordo para a expressão de acidez (International Organization for Standardization, 2020)	45
Tabela 6 - Diluições necessárias realizar, dependendo do nível de detecção pretendido (R-Biopharm, 2021a)	47
Tabela 7 - Comparação dos vários meios de cultura DG18 disponíveis no mercado, em relação ao seu modo de preparação e aos seus custos associados.....	51
Tabela 8 - Comparação dos resultados obtidos utilizando a técnica de incorporação e a técnica de espalhamento, em relação ao método de contagem de bolores e leveduras.....	52
Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos utilizando as placas preparadas manualmente e as placas Compact Dry, em relação ao método de contagem total de microrganismos.....	53
Tabela 10 - Comparação entre o método atual e o método alternativo para contagem total de microrganismos, contagem de bolores e leveduras e pesquisa de bactérias coliformes	53
Tabela 11 - Comparação entre o método atual e o método alternativo para contagem de E. coli e pesquisa de Salmonella	54
Tabela 12 - Comparação entre o método atual e o método alternativo de determinação do teor de gordura	55
Tabela 13 - Resultados obtidos nos testes realizados para determinação de ácidos gordos livres	56
Tabela 14 - Comparação entre o método atual e método alternativo de determinação do teor de humidade.....	58
Tabela 15 - Comparação entre o método atual e o método alternativo para detecção de micotoxinas...	59
Tabela 16 - Comparação entre o método atual e o método alternativo para detecção de alergénios	60
Tabela 17 - Comparação entre o método atual e o método alternativo para determinação de açúcares	60

Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
BGB – *Brilliant Green Bile Broth*
BPW – *Buffered Peptone Water*
CE – Conselho Europeu
DNA – *Deoxyribonucleic Acid*
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Point*
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
ISO – *International Organization for Standardization*
KOH – Hidróxido de Potássio
LOD – *Limit of Detection*
NaOH – Hidróxido de Sódio
NASA – *National Aeronautics and Space Administration*
NP – Norma Portuguesa
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCA – *Plate Count Agar*
PCC – Pontos Críticos de Controlo
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
RBC – *Rose Bengal Chloramphenicol Agar*
RFID – *Radio-frequency Identification*
UE – União Europeia
UFC – Unidades Formadoras de Colónias

Capítulo 1. Introdução

Este capítulo expõe um enquadramento e os objetivos desta dissertação de mestrado, assim como, a empresa onde se irá realizar o estágio. Para além disso, é apresentada a metodologia da dissertação de forma a cumprir os objetivos estabelecidos.

1.1. Enquadramento

O chocolate é um dos alimentos favoritos do mundo, sendo a Europa o maior mercado produtor e exportador deste produto. O consumo médio mundial de chocolate é estimado em 0,9 kg per capita por ano, mas os países europeus apresentam médias significativamente mais altas (CBI - Ministry of Foreign Affairs, 2020). Em Portugal, o maior produtor de chocolates é a Imperial (Imperial, 2021).

Sendo este um produto alimentar, é necessário garantir a sua qualidade. A qualidade do chocolate e de qualquer outro produto alimentar está diretamente relacionada com a sua segurança para o consumidor, no entanto devem ser tidos em conta não só os requisitos legais como os requisitos dos próprios consumidores. Assim, é considerado um alimento seguro aquele que cumpre com os atributos estabelecidos para a qualidade e é medido através do risco e perigo. Apesar de haver opiniões distintas sobre se há ou não produtos realmente seguros, o objetivo é diminuir o risco até um nível aceitável, isto é, que se entende poder assumir.

Devido a esta necessidade de garantir a qualidade dos produtos e serviços, causada, não só, mas principalmente por exigências do mercado, surgiram várias organizações cuja função é promover a normalização destes produtos e serviços, através da utilização de determinadas normas. Desta forma, as empresas optam por obter esta certificação para a melhoria contínua e a excelência dos Sistemas de Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar.

1.2. Objetivos

Desde a receção das matérias-primas até ao embalamento do produto final, vários são os perigos que podem surgir no chocolate, quer sejam de natureza física, química, biológica ou nutricional. A maioria dos perigos são controlados à priori pela implementação de regras de boas práticas de higiene e produção ou pela avaliação dos fornecedores. No entanto, é na mesma necessário realizar análises periódicas, para garantir que estes estão dentro dos limites estabelecidos. Para além disso, para que as características do produto não se alterem e se garanta a qualidade do chocolate, também é possível determinar os parâmetros físico-químicos, como o teor de gordura e humidade.

Assim, o principal objetivo desta dissertação é a pesquisa de técnicas alternativas para a realização de análises de rotina de controlo de qualidade na Imperial. Atualmente, a empresa realiza análises microbiológicas: contagem total de microrganismos, contagem de bolores e leveduras e pesquisa de bactérias coliformes; análises físico-químicas: determinação do teor de gordura e humidade; análises químicas: micotoxinas; e análises nutricionais: presença de alergénios e açúcares. As alternativas devem ser mais rápidas e fáceis de executar, sendo por isso necessário testar e avaliar a viabilidade da sua aplicação.

1.3. A empresa: Imperial

A Imperial posiciona-se atualmente como o maior fabricante nacional de chocolates e é detentora das principais marcas do mercado. Para além disso, a empresa tem uma forte aposta internacional através da introdução e comercialização das suas marcas em diferentes mercados, estando presente em mais de 45 países, distribuídos por quase todos os continentes (Imperial, 2021).

Esta empresa foi fundada em 1932 em Vila do Conde, por Manuel Dias da Silva que regressou do Brasil com uma nova fórmula de chocolate concretizando o sonho de criar uma fábrica de chocolates em Portugal com o apoio do seu irmão e de um amigo. Porém, só a partir de 1973, com a compra da Imperial - Produtos Alimentares, S.A. pelo Grupo RAR, é que a empresa começou uma fase crescente de sucesso. Os investimentos realizados levaram a um aumento da capacidade produtiva e à criação de marcas que atingiram um elevado nível de notoriedade no mercado português de chocolates, como é o caso da Pintarolas, da Fantasias e da Jubileu, lançadas no início da década de 80 (Imperial, 2021).

Por volta de 1985, o mercado de chocolates português era dominado por duas empresas: a Regina, a Sul e a Imperial, a Norte. A empresa Regina, com o aparecimento das cadeias de distribuição modernas e de multinacionais em Portugal, começou a perder a sua capacidade competitiva, resultando numa queda de vendas (Imagens de Marca, 2011). Pelo contrário, a empresa Imperial cresceu em 1993, com a criação da Imperial - Comércio e Distribuição de Produtos Alimentares, S.A., como resposta à evolução do sector e para garantir uma maior flexibilização e especialização, autonomizando-se a atividade industrial da comercialização e distribuição dos produtos (Imperial, 2021).

Desta forma, e apesar do declínio da empresa Regina, a Imperial decide em 2000, adquirir esta marca ao reconhecer o seu grande potencial e depois de vários estudos de mercado realizados. Assim, a Imperial relança a marca Regina na Páscoa de 2002, com uma nova geração de produtos, como as amêndoas e avelãs cobertas com chocolate, que rapidamente conquistaram a liderança do mercado

(Imagens de Marca, 2011). Ainda no ano 2002, a Imperial foi certificada no Sistema de Gestão da Qualidade segundo a norma ISO 9001:2000 (Imperial, 2021).

Em 2004, houve a fusão das duas empresas existentes, por incorporação da Imperial – Comércio e Distribuição de Produtos Alimentares, S.A. na Imperial – Produtos Alimentares, S.A. e devido ao contínuo crescimento, a Imperial inaugurou em 2007 uma nova unidade industrial de moldação e embalagem de tabletes e bombons. Este investimento providenciou à empresa meios tecnológicos que lhe permitiram não só aumentar a sua capacidade de produção como também desenvolver novos produtos diferenciadores. Consequentemente, em 2008, a Imperial reforça a sua presença no mercado ao aumentar o seu portfólio de produtos como tabletes, frutos secos com chocolate e bombons e ainda rejuvenesceu as suas marcas emblemáticas, Regina e Jubileu. Para além disso, em 2009 a empresa realizou um investimento numa nova linha de fabrico de massas de chocolate que entrou em funcionamento em 2010 (Imperial, 2021).

Em 2015, a Imperial foi adquirida pelo fundo *Vallis Sustainable Investments I*, levando em 2017 a um investimento numa nova unidade industrial de drageias de chocolate com a mais avançada tecnologia, como comemoração dos 85 anos. Nos últimos anos, tendo a inovação como prioridade estratégica, a Imperial adaptou os seus produtos a requisitos muito específicos, o que permitiu o seu lançamento em segmentos especiais, como chocolates sem açúcar ou com redução de açúcar, vegan, + proteína, sem glúten, Kosher e Halal (Imperial, 2021).

Já em 2020, a Imperial registou uma quebra de mais de 50 % na procura dos seus produtos direccionados para a Páscoa, devido à pandemia de covid-19, uma vez que o chocolate não é considerado um bem essencial (Jornal Renovação, 2020). De facto, o confinamento provocado pela pandemia veio alterar os hábitos de consumo dos apreciadores de chocolate a nível mundial e este ano, a Imperial registou uma maior procura por tabletes de chocolate e produtos de culinária, em vez dos bombons e frutos secos cobertos de chocolate, segmento que mais cresceu em 2019 (Castro, 2020).

Apesar de tudo, a Imperial investiu 3 000 000 € numa nova unidade de moldação e embalamento, o que permitirá aumentar 30 % da sua capacidade produtiva daquele que é o maior segmento do mercado de chocolates a nível mundial, as tabletes de chocolate (Castro, 2020; Imperial, 2021). Na Figura 1, é possível observar alguns dos produtos da vasta gama da Imperial.



Figura 1 - Exemplos de marcas Imperial: Pintarolas, Regina e Pantagruel (Adaptado de Imperial, 2021).

1.4. Metodologia de investigação

De modo a atingir os objetivos definidos anteriormente, a metodologia de trabalho desenvolvida passou pelas seguintes fases:

1. Análise dos métodos atualmente utilizados pela empresa
 - a. Observar e acompanhar os métodos atualmente utilizados pela empresa para a realização de análises microbiológicas de rotina, para garantir o controlo de qualidade.
 - b. Registar eventuais limitações que os métodos atualmente utilizados possam apresentar.
2. Pesquisa de métodos alternativos
 - a. Pesquisar métodos alternativos em fontes bibliográficas fidedignas;
 - b. Comparar a documentação existente e recolhida nos laboratórios sobre os métodos atualmente utilizados com a documentação recolhida de métodos alternativos;
 - c. Analisar se as alternativas propostas implicam alterações nos materiais e equipamentos disponíveis na empresa;
 - d. Avaliar o custo do material atual em comparação com o custo do material alternativo.
 - e. Por último, selecionar um método alternativo para cada tipo de análise de rotina necessária.
3. Teste e viabilidade dos métodos alternativos
 - a. Testar métodos alternativos escolhidos em diversos produtos acabados e matérias-primas;
 - b. Concluir se os métodos alternativos são ou não viáveis para implementação no laboratório da empresa.

1.5. Estrutura da dissertação

Esta dissertação encontra-se estruturada em cinco capítulos principais, que por sua vez se dividem em subcapítulos. Neste primeiro capítulo, é feito um enquadramento geral sobre o trabalho desenvolvido, nomeadamente a apresentação do tema, incluindo os principais objetivos definidos e ainda uma descrição sobre a empresa.

No segundo capítulo, intitulado por “Revisão bibliográfica”, apresenta-se todo o contexto teórico subjacente ao assunto da dissertação, nomeadamente, a história do chocolate, o processo de produção do chocolate e a forma como se realiza o controlo de qualidade na produção de chocolate.

No terceiro capítulo, designado por “Pesquisa de técnicas alternativas às análises de rotina”, são apresentadas todas as análises de rotina atualmente utilizadas no controlo de qualidade da Imperial, sendo posteriormente exposto um conjunto de técnicas alternativas para essas análises de rotina.

No quarto capítulo, cujo nome é “Teste e viabilidade das alternativas propostas”, realiza-se uma apresentação dos resultados dos testes efetuados às alternativas propostas no capítulo anterior, e é feita uma comparação entre o método atual e a alternativa proposta, de forma a perceber qual a mais adequada e qual a viabilidade de aplicação da alternativa proposta.

Por fim, no quinto capítulo, apresenta-se as principais conclusões obtidas no trabalho desenvolvido, bem como algumas recomendações futuras, nomeadamente, no que diz respeito ao teste de algumas das alternativas propostas.

Capítulo 2. Revisão bibliográfica

Neste capítulo são apresentados os tópicos mais relevantes para compreender o tema desta dissertação, nomeadamente: **A História do chocolate**, **Processo de produção de chocolate** e, por último, **Controlo de qualidade do chocolate**. Com esta pesquisa bibliográfica, pretende-se facultar um enquadramento sobre como surgiu e como se produz chocolate, bem como a importância do controlo de qualidade dos alimentos em geral, e do chocolate, em particular.

2.1. A História do chocolate

O chocolate é um produto alimentar produzido a partir da planta do cacau (cacaueiro), que se encontra em estado sólido à temperatura ambiente normal, mas que se derrete facilmente na boca (Beckett, 2008). Este é conhecido mundialmente pelo seu sabor doce e prazeroso, fazendo com que quase todas as pessoas, principalmente as crianças, o adorem (Verna, 2013). Por este motivo, o chocolate está muitas vezes associado a determinadas festividades, como por exemplo o Dia dos Namorados ou a Páscoa.

Em relação à origem do cacau, acredita-se que este exista há cerca de 3 000 ou 4 000 anos (Cook, 1982) e que as primeiras plantações conhecidas tenham sido estabelecidas pelo povo maia nas planícies do Sul de Yucatan, no México, por volta de 600 d.C. (Beckett, 2008). Apesar de não ser possível saber verdadeiramente onde e quando cresceu o cacaueiro pela primeira vez, é importante referir que a planta que se conhece hoje é o resultado da seleção e cruzamento que começou há milhares de anos (Verna, 2013).

Em 1 200 d.C., com o domínio asteca sobre os maias, os grãos de cacau passaram a ter grande valor: eram utilizados não só como alimento, mas também como moeda de troca. De acordo com alguns registos antigos, os astecas acreditavam que o cacaueiro tinha origem divina, através do deus Quetzalcoatl que o tinha trazido à Terra. Assim, aprenderam a torrar e a moer os grãos, de forma a obter uma pasta nutritiva e solúvel em água. Com a adição de especiarias, como a canela e a pimenta, que realçavam o sabor forte e amargo, surgiu a bebida “xocolatl” (Verna, 2013). Esta bebida foi particularmente apreciada pelo imperador Montezuma, que supostamente consumia dezenas de xícaras por dia, mais pelos seus efeitos revigorantes e estimulantes do que propriamente pelo seu sabor (Beckett, 2008). Assim, o chocolate começou por ser uma bebida amarga, gordurosa e fria, devido à forma como o cacau era produzido, muito diferente das dos dias de hoje.

Em 1502, reza a história que Cristóvão Colombo teve o primeiro contacto com o cacau e até comprou alguns grãos para levar para a Europa, mas só quando os espanhóis conquistaram o México é que Don

Cortez trouxe a bebida para o Velho Continente em 1520 (Afoakwa, 2010; Beckett, 2008). No início, os espanhóis seguiram a receita dos astecas, com adição de pimenta e especiarias picantes, mas o sabor amargo e adstringente da “xocolatl” fez com que nem todos a apreciassem. Mesmo com a adição de açúcar para tornar o sabor doce e macio, esta bebida permaneceu praticamente desconhecida no resto da Europa por quase cem anos (Beckett, 2008; Verna, 2013).

A partir de 1660, o chocolate quente doce começou a espalhar-se por vários países da Europa como remédio, mas como esta bebida era muito cara, a sua difusão deu-se por meio das relações entre famílias poderosas (Beckett, 2008). Contudo, só a partir do século XVIII, com a Revolução Industrial, é que o consumo de chocolate se tornou amplamente alargado, desde a Inglaterra à Itália, apesar das muitas diferenças culturais e políticas. Esta crescente procura por grãos de cacau levou à introdução da planta nas colónias portuguesas, britânicas e holandesas em África e na Ásia, provocando uma queda do preço do cacau (Afoakwa, 2010; Cidell & Alberts, 2006).

De facto, a Revolução Industrial trouxe mudanças importantes para a indústria do chocolate, que influenciaram fortemente a produção e o consumo de chocolate. Primeiro, Joseph Fry, na Inglaterra, usou uma máquina a vapor para moer grãos de cacau, fazendo com que este produto fosse processado em grande quantidade e se tornasse mais acessível. Mais importante, porém, foi a aplicação de métodos de produção industrial que incluíssem o uso do que antes era considerado desperdício (Cidell & Alberts, 2006). Em 1828, o químico holandês van Houten inventou uma prensa hidráulica que separava a gordura em excesso (manteiga de cacau) da pasta de cacau, formando a torta de cacau que podia depois ser transformada em pó com 23 % de cacau (Afoakwa, 2010; Minifie, 2012). Apesar deste processo ter melhorado a qualidade do chocolate consumido, também provocou uma perda de cerca de 30 % da pasta de cacau na forma de manteiga de cacau (Dand, 2011a). Simultaneamente, Joseph Fry e os filhos estavam a tentar produzir chocolate na sua forma sólida e acabaram por descobrir que a manteiga de cacau extraída afinal possuía valor. Ao ser adicionada à pasta de cacau e açúcar, a manteiga de cacau permite que a mistura alcance a consistência e o sabor certos para fazer chocolate sólido (Afoakwa, 2010; Cidell & Alberts, 2006).

Mais ainda, em 1876, Daniel Peter formulou a primeira receita comercial de chocolate de leite, utilizando a invenção de leite em pó de Henry Nestlé, cuja fábrica de laticínios ficava ao lado da sua (Afoakwa, 2010; Minifie, 2012). Para além do sabor mais suave, o chocolate de leite trouxe a vantagem de ser mais barato, pois menos quantidade da matéria-prima mais cara – o cacau – é necessário. Vários outros seguiram o exemplo de fazer este chocolate de sabor mais suave e, atualmente, este constitui a maior parte do consumo de cacau (Dand, 2011a).

Finalmente, em 1879, Rodolphe Lindt apresentou a última grande técnica de fabrico para produzir o chocolate "moderno": a conchagem. Este processo, que consiste numa mistura da pasta de cacau com a manteiga de cacau, a temperaturas elevadas, permite produzir uma massa de chocolate mais lisa e fina e melhorar o sabor do chocolate, removendo alguns ácidos voláteis (Dand, 2011a). Só a partir de 1900, com a queda de preço dos dois principais ingredientes, o cacau e o açúcar, é que o chocolate se tornou acessível à classe média. Nas décadas seguintes, matérias-primas mais baratas e processos de produção mais eficientes surgiram na vanguarda da inovação com tecnologias de fabrico rápidas e novas técnicas de marketing, democratizando o consumo de chocolate (Afoakwa, 2010).

Nos últimos anos, vários produtores de chocolate transmitiram a ideia de que quanto maior a percentagem de pasta de cacau e, conseqüentemente, menor a quantidade de açúcar e leite, “melhor” é o chocolate. Contudo, os testes aos consumidores mostram uma preferência de 50 a 60 % de pasta de cacau (Cidell & Alberts, 2006).

Assim, apesar da produção de chocolate sólido só ter começado em 1847, este tornou-se muito popular e superou o chocolate líquido em termos de vendas no início do século XX, mantendo-se até aos dias de hoje. Esta mudança também levou à formação de dois tipos de fabricantes: os que convertem os grãos de cacau em pasta de cacau, manteiga de cacau ou cacau em pó, e os que realmente fazem o chocolate e, embora, não muito bem definida, esta distinção ainda existe (Dand, 2011a).

2.2. Processo de produção de chocolate

Após um enquadramento histórico sobre o chocolate e a forma como este era antes consumido, é agora necessário conhecer as matérias-primas e as operações unitárias envolvidas na produção de chocolate em grande escala. A forma como o chocolate é feito determina o sabor e a textura finais do chocolate (Talbot, 2009). Na Figura 2 encontra-se o fluxograma do processo de produção de chocolate, na sua forma mais simplificada possível.

Em seguida, serão apresentadas todas as etapas do processamento de chocolate, desde os grãos do cacaueiro até ao embalamento do chocolate. Porém, tal como já foi dito, há uma distinção entre as empresas produtoras de manteiga e pasta de cacau e as produtoras de chocolate, como é o caso da Imperial.

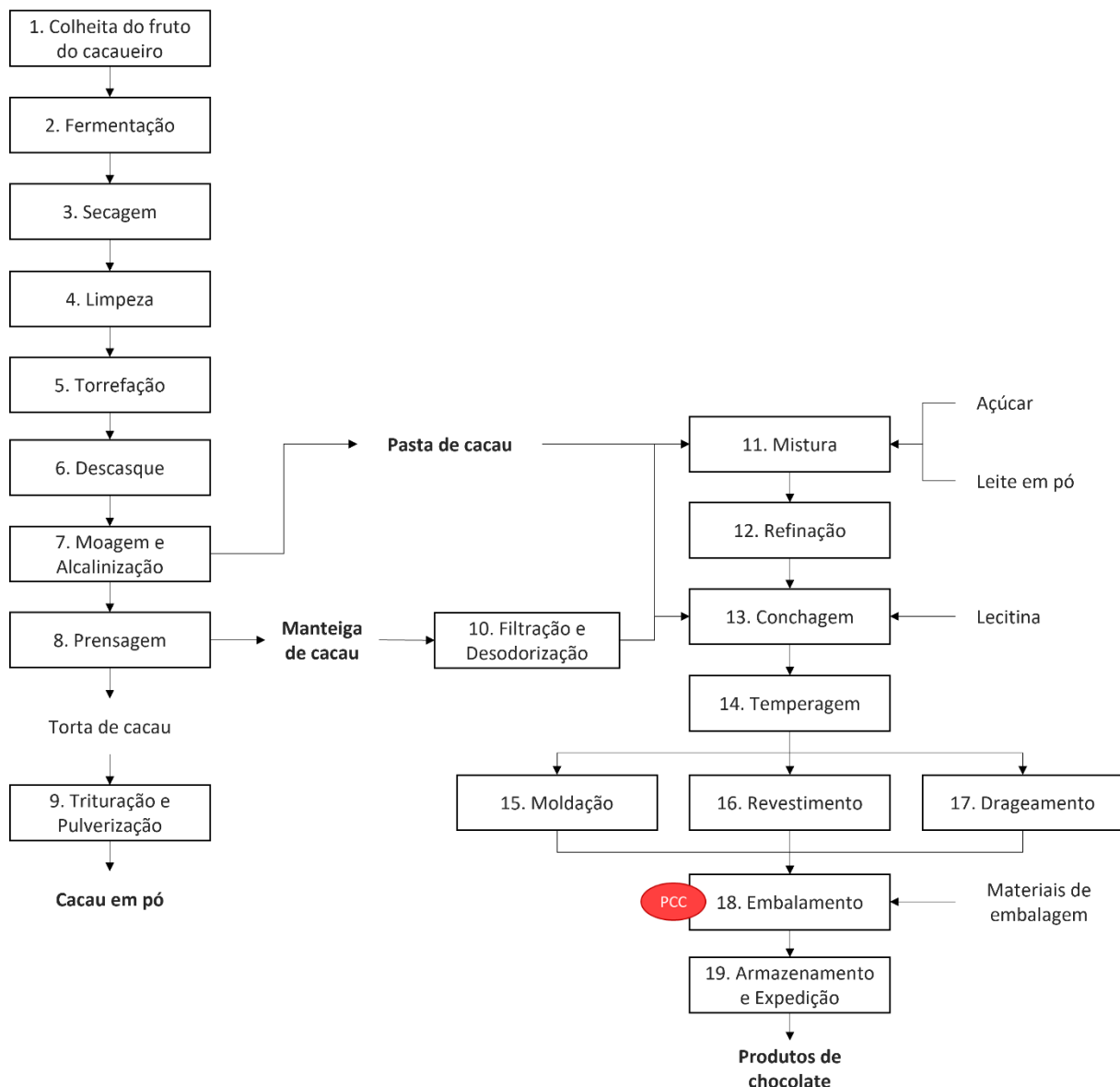


Figura 2 - Fluxograma do processo de produção de chocolate.

2.2.1. Transformação dos grãos de cacau

Cerca de 90 % do cacau mundial é cultivado por pequenos proprietários. Apesar do cacau ter surgido no norte da América do Sul e na América Central, atualmente a planta do cacau é cultivada em várias zonas do globo, maioritariamente na África, sendo que 40 % é proveniente da Costa do Marfim (Talbot, 2009). Quanto à planta do cacau, de nome científico *Theobroma cacao*, existem quatro tipos: Criollo, Forastero, Trinitario e Nacional. Atualmente, a subespécie Forastero é a mais conhecida e representa grande parte da produção mundial de cacau devido à sua grande resistência a doenças, sendo por isso facilmente cultivada. Contrariamente, a subespécie Criollo possui uma baixa representatividade da produção mundial devido à sua predisposição a doenças, tornando assim difícil o seu cultivo (Caligiani, Marseglia, & Palla, 2016).

Em relação à variedade de cacau Trinitario, esta surgiu como resultado da hibridização entre as subespécies Crioulo e Forastero e não pode ser encontrada na natureza. Já a subespécie Nacional, é conhecida por produzir os grãos com sabor “arriba” que possui simultaneamente notas de sabor floral e picante (Beckett, 2009). Apesar das diferenças existentes, todos estes tipos de cacau crescem em áreas de alta pluviosidade, preferindo grandes percentagens de humidade, normalmente entre 70 e 80 % e as temperaturas médias devem estar entre os 18 °C e os 32 °C (Talbot, 2009).

Por outro lado, a maioria dos cacauzeiros possuem períodos de floração bem definidos (duas vezes ao ano), mas existem algumas plantas que florescem quase continuamente. Assim, os frutos dos cacauzeiros desenvolvem-se, normalmente, após cinco a seis meses e são colhidos manualmente dos troncos e galhos. Posteriormente, é necessário abrir o fruto ou vagem de maneira a soltar os grãos, tal como se pode verificar na Figura 3 (Talbot, 2009).



Figura 3 - Grãos de cacau no fruto ou vagem (Cook, 2021).

Por norma, existem cerca de 30 a 45 grãos na vagem, cobertos por uma polpa branca que se encontra presa a um núcleo central. Neste momento, os grãos não contêm os produtos químicos que dão os sabores conhecidos. Estes sabores formam-se e desenvolvem-se durante as etapas seguintes, que são a fermentação e secagem (Talbot, 2009). Na etapa de fermentação, vários métodos podem ser usados, dependendo do agricultor, da área ou país, por exemplo. Assim, os grãos frescos podem ser colocados em caixas de madeira, cestos ou até em pilhas cobertas com folhas de bananeira, como acontece na África Ocidental (Giacometti, Jolić, & Josić, 2015). Nesta fase, ocorrem reações químicas, porque a polpa branca contém leveduras e bactérias naturais que causam a quebra dos açúcares e da mucilagem, havendo mudança de cor e formação de alguns dos precursores de sabores (Talbot, 2009).

De seguida, como os grãos fermentados possuem um teor de humidade de cerca de 55 %, é necessário reduzir os níveis de humidade para os 7 % a 8 %, para que seja possível realizar um adequado armazenamento e transporte (Giacometti et al., 2015). Assim, os grãos são expostos ao sol durante 12 a 20 dias em locais onde o clima é suficientemente ensolarado. Caso contrário, é necessário recorrer a métodos de secagem artificiais, utilizando ar quente com uma temperatura máxima de cerca de 60 °C (Caligiani et al., 2016). Para além de evitar a consequente formação de bolores, esta etapa é de extrema importância para manter o sabor e a textura dos grãos. Se a humidade for muito elevada, os grãos irão ficar mofados, dando um sabor desagradável e se a humidade estiver abaixo dos 6 %, estes ficam muito quebradiços, sendo difícil o seu posterior processamento (Talbot, 2009).

Por fim, os grãos são separados por tamanho e qualidade e armazenados em sacos para depois serem vendidos ou utilizados noutro local (Caligiani et al., 2016). Assim, é importante referir que a qualidade do grão depende de vários fatores, não só do tipo de cacau e de solo, como também das condições climáticas. Além destes fatores, as etapas de fermentação e secagem também influenciam diretamente o sabor final do grão (Talbot, 2009).

2.2.2. Produção de pasta de cacau, manteiga de cacau e cacau em pó

Os grãos de cacau chegam à fábrica em sacos e devem ser imediatamente utilizados ou então armazenados em boas condições. Se forem armazenados, estes devem ser colocados em salas frias, secas e bem ventiladas, para que os grãos não sejam expostos a odores e humidade elevada e deve-se garantir a proteção dos sacos contra infestações. Assim, os grãos de cacau passam primeiro por uma máquina de limpeza, em que são removidos materiais estranhos, como paus, pedras, metais e fibras do próprio saco de transporte que podem provocar problemas nas máquinas seguintes (Cook, 1982).

De seguida, os grãos são torrados, usando tanques de agitação a uma temperatura inferior a 150 °C, durante 30 a 120 min (Caligiani et al., 2016). Esta etapa serve principalmente para desenvolvimento do aroma que denominamos de chocolate, eliminação de ácidos voláteis, escurecimento da cor do grão para um castanho mais profundo e eliminação do excesso de humidade (Cook, 1982). Consequentemente, é necessário remover as cascas dos grãos que ficaram mais soltas com a torrefação. Esta etapa de descasque recorre à aspiração (joeiramento), sendo necessário controlar o volume e a velocidade do ar para que resultem os *nibs*, como se observa na Figura 4 (Talbot, 2009).



Figura 4 - Separação das cascas dos grãos de cacau, formando os nibs (Adaptado de Frangioni, 2016).

Posteriormente, os *nibs* de cacau que contém aproximadamente 55 % de uma gordura (manteiga de cacau) são reduzidos por moagem até formarem a pasta de cacau. Esta transformação só acontece porque a maior parte dessa gordura é libertada e, para tal, o processo é dividido em duas fases. Numa primeira fase, os *nibs* são partidos por martelos ou alfinetes, num moinho de impacto e numa segunda fase, a pasta de cacau já produzida é tornada mais fina, num moinho de discos ou bolas (Talbot, 2009).

Uma outra etapa opcional é a alcalinização ou o chamado *Dutching process*, que consiste na adição de uma solução alcalina diluída a 75-100 °C, podendo ser aplicada à pasta de cacau (após a moagem), ou aos *nibs* de cacau, com posterior neutralização e secagem (antes da moagem) (Caligiani et al., 2016). Embora este tratamento tenha surgido para fazer com que o cacau em pó não se aglomerasse quando adicionado ao leite ou à água, este é atualmente utilizado para mudar a cor e o sabor da pasta de cacau resultante (Giacometti et al., 2015). A cor tende a ficar mais escura, mas o sabor fica mais suave, provavelmente porque os ácidos fortes foram neutralizados. Porém, a mudança nas características do sabor é difícil de descrever, porque algumas pessoas gostam desta mudança e outras não (Cook, 1982).

Após a obtenção da pasta de cacau, uma parte é embalada e vendida para fábricas de produção de chocolate e a outra é enviada para a prensagem, de forma a separar a manteiga de cacau e produzir a torta de cacau. Assim, a pasta de cacau é colocada num depósito e aquecida a uma temperatura de 90 °C a 100 °C e só depois é bombeada para a prensa hidráulica, representada na Figura 5 (Cook, 1982).



Figura 5 - Prensa de cacau de 12 potes (Machine Sale, 2020).

A prensa moderna é uma enorme máquina horizontal com diversos potes ou painéis, individualmente equipados com telas de filtro de metal. Assim, a pasta de cacau quente é bombeada para os potes sob pressão, forçando imediatamente a manteiga de cacau através das telas de filtro em ambos os lados de cada um dos potes. Esta é lentamente extraída para uma calha e encaminhada para uma bandeja localizada numa balança, que é utilizada para perceber se toda a manteiga de cacau pretendida já foi removida. Já em cada uma das painéis, forma-se um bolo duro, em forma cilíndrica, chamado de torta de cacau. O tempo de prensagem, por lote, depende da quantidade de manteiga de cacau que se pretende remover, mas a programação típica é de 5 min para uma torta de cacau restante com 22-24 % de manteiga de cacau ou 30 a 45 min para uma torta de cacau com 10-12 %, podendo atingir-se valores de pressão superiores a 6 000 psi, durante o processo (Cook, 1982).

Em relação à manteiga de cacau extraída, esta deve ser filtrada com clareza num qualquer filtro de óleo disponível, porque, após a prensagem, ainda carrega consigo uma pequena quantidade de partículas não gordurosas da pasta de cacau. De facto, estas partículas não gordurosas contribuem para um sabor e cor característicos, que não devem estar presentes na manteiga de cacau. Pode-se ainda realizar a desodorização da manteiga de cacau com vapor sob alto vácuo antes desta ser vendida (Cook, 1982; Minifie, 2012).

Segundo o Anexo I da Diretiva 2000/36/CE (Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2000), a manteiga de cacau é a matéria gorda obtida a partir de grãos de cacau, que é caracterizada pelo teor de ácidos gordos livres (expresso em ácido oleico), num máximo de 1,75 %, e pelo teor de matérias insaponificáveis (determinado pelo éter de petróleo), cujo máximo deve ser 0,5 %, exceto no caso da manteiga de cacau obtida por pressão, em que o máximo é 0,35 %. Por outro lado, é importante

conhecer a estrutura molecular da manteiga de cacau. Quimicamente, esta não é considerada um único tipo de gordura, mas sim um grupo de gorduras: os triglicerídeos. Apesar dos triglicerídeos poderem variar em composição, todos eles apresentam uma estrutura semelhante: três cadeias separadas de ácidos gordos, cada uma ligada a um dos três átomos de carbono de uma molécula anterior de glicerol. A Figura 6 apresenta a estrutura básica de um triglicerídeo (Dand, 2011b)

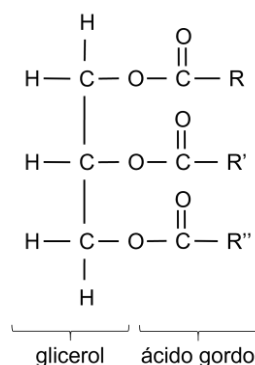


Figura 6 - Estrutura de um triglicerídeo (Adaptado de Dand, 2011b).

Por sua vez, as tortas de cacau são manualmente descarregadas da prensa e encaminhadas para a etapa de trituração e pulverização, de forma a produzir o cacau em pó. Se o teor de manteiga de cacau for muito baixa, a torta de cacau será muito dura e, portanto, numa primeira fase utiliza-se um britador, que geralmente possui rolos rotativos com dentes entrelaçados, que partem a torta em pequenos pedaços. Como este pó ainda se encontra granuloso, então numa segunda fase, este passa por moinhos de martelo (Minifie, 2012).

Novamente e segundo a legislação (Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2000), o cacau em pó designa o produto obtido pela transformação em pó dos grãos de cacau limpos, descascados e torrados que contém no mínimo 20 %, em massa, de manteiga de cacau e no máximo 9 % de humidade. Este produto é posteriormente embalado e vendido ao cliente final que o utiliza, por exemplo, na confeção de bolos, ou a empresas que fazem chocolate e chocolate em pó.

2.2.3. Produção de chocolate

Para a produção de chocolate propriamente dita, as respetivas empresas começam por receber as matérias-primas e os materiais de embalagem necessários que devem ser armazenados adequadamente. Assim, a primeira fase deste processo consiste na mistura da pasta de cacau com a manteiga de cacau, leite em pó e açúcar moído, cujas quantidades dependem da fórmula específica que se pretende criar. Apesar de se poderem utilizar vários tipos de equipamentos, normalmente utiliza-se um misturador com agitação, a uma temperatura de 40 °C, durante cerca de 15 min (Cook, 1982).

Mais uma vez, a legislação (Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2000) apresenta as definições para cada tipo de chocolate. Por exemplo, “chocolate” refere-se a um produto obtido a partir do cacau e de açúcares que contém no mínimo 35 % de matéria seca total de cacau, dos quais pelo menos 18 % são de manteiga de cacau, e no mínimo 14 % de matéria seca de cacau isenta de gordura. Na Tabela 1 é possível encontrar alguns exemplos de formulações.

Tabela 1 - Exemplos de formulações para diferentes tipos de chocolate (g/100g) (Caligiani et al., 2016)

Chocolate Ingredientes	Chocolate (50 % cacau)	Chocolate (70 % cacau)	Chocolate de leite	Chocolate branco
Pasta de cacau	35	70	12	-
Manteiga de cacau	15	-	22	30
Açúcar	50	30	51	50
Leite gordo em pó	-	-	15	20

De seguida, a massa de chocolate sofre uma refinação, cujo objetivo é reduzir o volume das partículas de tal forma que se obtenha uma boa textura (suave e macia) e uma homogeneização do sabor (Cook, 1982). Dependendo do tipo de chocolate que se pretende produzir, a massa pode ser mais ou menos reduzida e para tal utiliza-se um refinador de cinco cilindros. Tal como se observa na Figura 7, este equipamento possui cinco rolos horizontais colocados uns em cima dos outros que giram sobre si de forma alternada. Para aumentar a eficiência da refinação, é comum utilizar-se um pré-refinador composto por apenas dois cilindros (Beckett, 2009).



Figura 7 - Equipamento refinador de cinco cilindros (ExportersIndia.com, 2021).

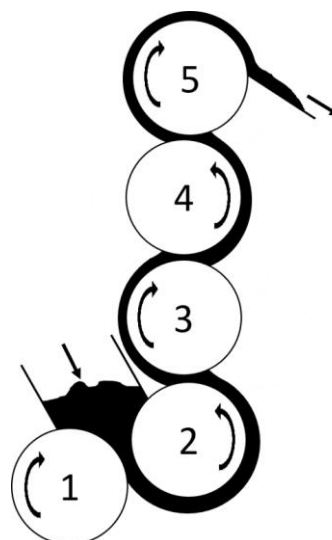


Figura 8 - Diagrama de funcionamento do refinador (Adaptado de Cocoa & Chocolate online, 2021).

Tal como se pode observar na Figura 8, a massa de chocolate é inserida na base do refinador e, portanto, a taxa de alimentação determina o rendimento e a finura final do chocolate. Da base para o topo, a velocidade de rotação dos cilindros torna-se progressivamente mais rápida e a distância entre eles é cada vez menor. Assim, forma-se uma película de chocolate que, quando chega ao último cilindro, no topo, é raspada por uma faca estacionária (Beckett, 2009). A redução de tamanho é o resultado combinado de compressão e cisalhamento. Porém, é de notar que os cilindros são ociosos e a sua temperatura é controlada a partir do fluxo de água que passa por eles. A temperatura altera a viscosidade do chocolate, alterando as propriedades de fluidez da gordura presente (Talbot, 2009).

A massa de chocolate refinada é então enviada para a conchagem, onde se adiciona mais manteiga de cacau, lecitina, um emulsionante que reduz a tensão superficial e permite obter uma mistura homogênea e opcionalmente também aromas. Assim, a massa é misturada e moída a temperaturas normalmente entre os 65 °C e os 75 °C, durante algumas horas ou mesmo vários dias, dependendo do tipo de chocolate que se pretende produzir (Caligiani et al., 2016). O facto da massa estar sempre em agitação e a temperaturas elevadas, possibilita a remoção de voláteis indesejáveis e de humidade, através da evaporação, o que permite uma boa fluidez, isto é, uma redução da viscosidade da massa.

Para tal, pode-se optar por utilizar vários equipamentos, como um misturador com agitação ou a “concha”, representada na Figura 9. No entanto, este último é o mais comum, pois possui a vantagem de realizar de uma só vez, as etapas de mistura, refinação e conchagem, para massas que não precisem de grande refinação, como por exemplo, as sem açúcar adicionado (Talbot, 2009).



Figura 9 - Equipamento "concha" (Indiamart, 2021).

Por outro lado, é de salientar que a conchagem pode ser considerada seca ou líquida dependendo do momento em que a manteiga do cacau é adicionada ao processo. Na conchagem seca, a massa refinada vai-se liquefazendo e só no final do processo é que se adiciona a manteiga de cacau e a lecitina. Na

conchagem líquida, a manteiga de cacau é adicionada ao mesmo tempo que a massa refinada e a operação inicia-se com a massa já líquida (Talbot, 2009).

De seguida, ocorre a temperagem, em que o chocolate é tratado termicamente de forma a produzir uma pequena fração de cristais de gordura homoganeamente dispersos e altamente estáveis (Beckett, 2009). Posteriormente, estes cristais fazem com que o chocolate fique com a consistência ideal para ser moldado e permitem obter boas propriedades de derretimento (Cook, 1982).

De facto, a manteiga de cacau pode cristalizar-se em seis formas polimórficas (I – VI), dependendo da composição de triglicerídeos e ácidos gordos, influenciando posteriormente a forma como a gordura líquida se solidifica. Se o chocolate for bem temperado, a manteiga de cacau irá cristalizar-se na forma V (um polimorfo β), dando uma aparência brilhante e impedindo o efeito bloom (Afoakwa, 2010). O efeito bloom no chocolate é frequentemente caracterizado pela perda de brilho e pela presença de manchas cinzas / brancas, na superfície do chocolate, que se parecem com bolores (Beckett, 2009). Por outro lado, se o chocolate for mal temperado, a manteiga de cacau irá cristalizar-se na forma IV (um polimorfo também β), que posteriormente se transforma na Forma V, influenciando a cor à medida que a luz refletida é desorientada pelo crescimento instável e desorganizado dos cristais (Afoakwa, 2010).

O método de temperagem envolve as etapas de derretimento completo, arrefecimento até ao ponto de cristalização, a cristalização propriamente dita e o derretimento dos cristais instáveis, tal como se observa na Figura 10 (Beckett, 2009).

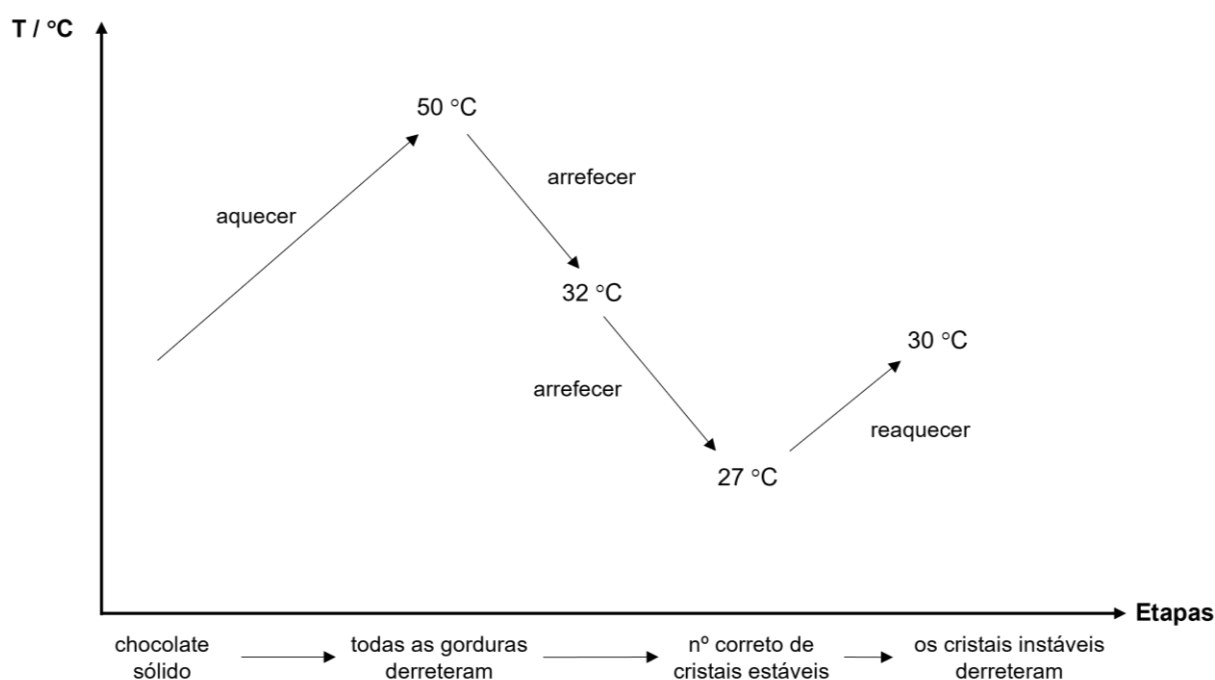


Figura 10 - Sequência de temperagem, durante a cristalização do chocolate (Adaptado de Beckett, 2009).

Tal como se pode constatar na Figura 10, o chocolate é primeiro aquecido até aos 50 °C, para garantir o derretimento completo da gordura. De seguida, sofre um arrefecimento até aos 32 °C e é misturado de forma a induzir a cristalização. Na terceira etapa, o chocolate é novamente arrefecido até aos 27 °C, correspondendo à cristalização propriamente dita e por fim, para que haja a conversão de quaisquer cristais instáveis, o chocolate é aquecido até aos 30 °C (Afoakwa, 2010). No entanto, é de notar que as temperaturas precisas podem variar dependendo da receita, do equipamento de temperagem e até mesmo da finalidade para a qual o chocolate será usado (Beckett, 2009).

Este processo ainda pode ser realizado manualmente para produzir pequenas quantidades de chocolate, colocando o chocolate numa tábua de mármore e misturando com uma espátula até começar a engrossar, mas as máquinas de temperagem automática são agora amplamente utilizadas (Beckett, 2009). Assim, é fundamental temperar o chocolate para que este tenha uma forma polimórfica adequada, que influencia as características de qualidade final, como cor, dureza, manuseio e acabamento (Afoakwa, 2010).

Depois da temperagem, o chocolate é colocado em depósitos que possuem filtros capazes de eliminar alguns contaminantes e depois, dependendo do tipo de produto que se pretende produzir, é possível realizar a moldação, o revestimento ou o drageamento. Em relação à moldação, este processo é utilizado maioritariamente para produzir tabletes, mas também pode ser usado para produzir figuras de chocolate. No equipamento representado na Figura 11 são depositadas porções volumetricamente medidas de chocolate para os moldes e opcionalmente pedaços de amêndoas, avelãs ou cereais (Cook, 1982). Imediatamente a seguir, os moldes são agitados para remover as bolhas de ar presas que podem estragar a aparência do chocolate ou até causar variações de peso (Beckett, 2009).



Figura 11 - Equipamento de moldação para tabletes de chocolate (Directindustry, 2021).

Os moldes são atualmente feitos de plástico e podem apresentar qualquer tipo de design, mas é importante que estes sejam construídos de forma a permitir a libertação imediata da peça de chocolate. Para tal, devem ser evitados moldes profundos ou com saliências nos cantos. Independentemente do tipo de molde usado, o produto passa de seguida num túnel de refrigeração, é depois desmoldado e, por último, é encaminhado para a secção de embalagem (Talbot, 2009).

Em relação ao revestimento, este método consiste no uso sortidos de confeitaria, onde se verte chocolate para produzir uma cobertura (Beckett, 2009). Apesar da existência de revestimento manual, este está associado a produtos caríssimos e exclusivos. Assim, de forma automática, os sortidos são colocados numa passadeira rolante em rede de arame e passam por uma cortina contínua de chocolate, havendo cobertura de todas as superfícies, tal como representado na Figura 12 (Minifie, 2012).



Figura 12 - Equipamento de revestimento em operação (Potrowl, 2019).

De seguida, os sortidos são submetidos a sopros de ventiladores e à vibração da rede, ambos reguláveis, que servem para controlar a quantidade de chocolate coberto em todas as superfícies. Para completar este processo, os sortidos passam por um túnel de refrigeração, de forma a endurecer a cobertura e facilitar o seu embalagem (Minifie, 2012).

Em relação ao drageamento, este é um processo único de revestimento de um centro com sucessivas camadas de chocolate, através da utilização de painéis giratórios feitas de cobre ou aço inoxidável, designadas drageadoras, como a representada na Figura 13. Atualmente, existem equipamentos mais modernos, em que todo o processo é automático, mas as painéis giratórios são ideais para lotes de pouca quantidade. Em relação aos centros, estes são normalmente amêndoas, avelãs, amendoins e cereais, mas também podem ser nozes, passas, cranberries ou nougat, desde que apresentem alguma consistência (Minifie, 2012).



Figura 13 - Equipamento utilizado para drageados.

Assim, as drageadoras podem ser operadas em diferentes velocidades e possuem um duto que aplica ar nos centros, com temperatura e humidade específica, enquanto estes giram. Para pequenas quantidades, o chocolate é adicionado manualmente durante a rotação, mas nas grandes instalações atuais esta etapa é automatizada (Minifie, 2012). Após a formação de várias camadas de chocolate em torno do centro e quando a superfície do drageado estiver lisa, adiciona-se um verniz, pois não há nada mais atraente para o cliente do que um doce de chocolate bem polido e brilhante (Beckett, 2009).

Por último, na secção de embalagem, o produto de chocolate é envolvido por uma película de alumínio e depois por um embrulho final que possui as indicações sobre o produto. Esta etapa é automatizada com controlo de peso e detetor de metais incluídos, de forma a garantir a qualidade e segurança do produto. Contrariamente, a fase seguinte necessita de grande mão-de-obra, pois o produto final deve ser colocado em caixas e posteriormente em paletes, para que possa ser transportado. Finalmente, o produto de chocolate é armazenado nas devidas condições e posteriormente expedido.

2.3. Controlo de qualidade na produção de chocolate

2.3.1. Importância do controlo de qualidade

A qualidade de um produto está, não só relacionada com a segurança desse produto para o ser humano, como também com os requisitos que o consumidor considera importantes. De facto, a segurança dos alimentos é de extrema importância, uma vez que este conceito está associado à não existência de perigos que possam afetar a saúde do ser humano (Certif, 2021).

O ser humano vive, desde sempre, rodeado de perigos que o possam afetar negativamente ou até provocar a morte. No entanto, o desenvolvimento de novas técnicas de produção e distribuição de alimentos, associados a novas formas de estar e a novos hábitos de consumo da humanidade, fez com que os perigos, já existentes, se tornassem mais resistentes e levou ao aparecimento de novos perigos. Consequentemente, tornou-se indispensável o controlo eficaz de toda a cadeia de produção e distribuição dos alimentos, através da criação de medidas específicas que promovam a obtenção de produtos com um grande nível de confiança, do ponto de vista da segurança alimentar (Certif, 2021).

Assim, surgiram várias entidades de certificação credíveis que, de forma independente e imparcial, garantem que as organizações produzam e distribuam produtos de forma segura e conforme as exigências definidas pelas suas normas (Certif, 2021). Porém, como a segurança dos alimentos é de extrema importância, é normal que algumas entidades públicas publiquem um conjunto de diplomas legislativos que promovam a vigilância do mercado (ASAE, 2017).

O programa de gestão da segurança dos alimentos mais conhecido e mais importante é o sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*). Este foi desenvolvido no final da década de 60 pela companhia americana Pillsbury, em conjunto com a NASA e o U.S. *Army Laboratories* em Natick, de forma a desenvolver técnicas seguras para o fornecimento de alimentos para os astronautas. Apesar de ter sido criado pelo setor privado, em 1980, a OMS e a FAO recomendam, a sua aplicação às pequenas e médias empresas, através do Codex Alimentarius e em 1993, o HACCP começa a fazer parte da regulamentação europeia, através da Diretiva 93/43/CE. Por sua vez, esta diretiva é revogada pelo Regulamento (CE) n° 853/2004 (Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2004), que estabelece as regras que todos os operadores do setor alimentar devem cumprir (ASAE, 2017).

Assim, esta análise de perigos e de pontos críticos de controlo tem como objetivo evitar potenciais perigos que possam causar danos aos consumidores, através da sua redução ou eliminação. Para tal, baseia-se na aplicação de 7 princípios e 12 etapas, como se pode observar na Figura 14.

As primeiras cinco etapas são essenciais para que as etapas seguintes sejam facilitadas e para tal é necessário que uma equipa de pessoas, devidamente selecionada, desenvolva um fluxograma do processo de produção e que conheça bem esse produto. A partir da sexta etapa, correspondente ao primeiro princípio, começa-se por identificar todos os possíveis perigos associados ao processo de produção do alimento. De seguida, é necessário realizar uma avaliação de risco que mede a probabilidade e severidade de cada perigo acontecer, permitindo definir se os perigos são ou não significativos (ASAE, 2017; Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2004).



Figura 14 - Etapas e princípios da metodologia HACCP.

Tal como já foi dito, estes perigos podem provocar graves danos à saúde do ser humano, podendo ser de natureza biológica, química ou física. Em relação aos perigos biológicos, estes incluem bactérias, fungos, vírus, parasitas, insetos e animais (pragas). Quanto aos perigos químicos, estes estão relacionados com contaminações de origem natural (ex. toxinas) ou não natural (ex. produtos de limpeza e desinfecção). Por último os perigos físicos representam objetos estranhos no alimento que podem ser intrínsecos (ex. espinhas ou cascas) ou extrínsecos (ex. vidros, madeira, metais, plásticos, objetos de uso pessoal, entre outros) (ASAE, 2017). Há quem também considere outra categoria, os perigos nutricionais, como que é o caso da presença de alergénios e açúcar em excesso (Beckett, 2009).

Após a identificação e análise dos possíveis perigos, é preciso identificar os pontos críticos de controlo (PCC's), isto é, as últimas etapas onde não é possível posteriormente eliminar ou reduzir esse perigo até a um nível aceitável. De seguida, é necessário estabelecer limites críticos concretos e validados, mensuráveis e objetivos, como por exemplo, medições de pH, temperatura e humidade. Finalmente, deve-se estabelecer um procedimento de monitorização desses PCC's e um plano de ações a adotar, caso esses limites sejam ultrapassados. Para além disso, é necessário implementar um sistema de verificação do funcionamento do plano HACCP e um sistema de registo de todos os testes efetuados, sendo necessário um controlo constante (Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2004).

No entanto, este plano só é eficiente se antes se assegurarem alguns pré-requisitos que incluem o que é comumente referido como boas práticas de fabrico (Beckett, 2009). Assim, as estruturas e

equipamentos da unidade fabril, o plano de higienização, o controlo de pragas, o abastecimento de água, a recolha de resíduos, os materiais em contacto com alimentos, a higiene pessoal e a formação são considerados pré-requisitos. Assim, a implementação de pré-requisitos e do sistema HACCP permite, respetivamente, controlar os perigos associados ao meio envolvente ao processo de produção e os perigos associados ao próprio processo de produção do alimento (ASAE, 2017).

2.3.2. Procedimentos usados no controlo de qualidade na produção de chocolate

Primeiramente, é importante perceber que a responsabilidade de fabricar um produto que esteja de acordo com o padrão da qualidade não pertence só ao departamento do controlo de qualidade, mas também ao departamento de produção. É um dever do departamento de produção pensar também na qualidade e não só na quantidade do produto, devendo assim existir uma ligação com o departamento do controlo de qualidade (Minifie, 2012). Desta forma, e em conformidade com os princípios do plano HACCP, existem três esferas de operação do departamento do controlo de qualidade: a avaliação das matérias-primas, o controlo do processo de fabrico e a inspeção do produto acabado, que serão aprofundadas nos tópicos seguintes, tendo por base o fabrico de chocolate.

2.3.2.1. Avaliação das matérias-primas e dos materiais de embalagem

Aquando da receção das matérias-primas e em articulação com o respetivo responsável, o departamento do controlo de qualidade deve realizar uma avaliação do produto recebido. Para tal, é necessário efetuar uma inspeção visual, retirar uma amostra representativa e realizar análises químicas que comprovem a conformidade do produto recebido. A amostragem é a etapa mais importante da inspeção da matéria-prima, porque uma amostra deve ser representativa do volume, de forma a não comprometer as análises subsequentes (Minifie, 2012).

No entanto, o nível de inspeção da matéria-prima depende de dois fatores: o tipo de matéria-prima e a confiança no fornecedor. Em relação ao tipo de matéria-prima, é possível constatar na Tabela 2 o método de inspeção usado para algumas matérias-primas, como açúcar, cacau em pó, leite e derivados, manteiga de cacau e pasta de cacau, havendo diferenças no nível de inspeção de cada uma.

Em relação ao teor de humidade, este é um dos parâmetros mais importantes na indústria alimentar, uma vez que pode afetar tanto a forma como um produto é usado e processado, como a sua qualidade e tempo de vida útil. Por sua vez, estes fatores influenciam o custo económico desse produto, quer devido a custos de transporte e armazenamento, quer por custos de perda do produto por contaminação. Em relação ao teor de gordura e ácidos gordos livres, estes são extrema importância em matérias-primas como a pasta de cacau, a manteiga de cacau e o leite e derivados, uma vez que afetam a qualidade do

chocolate que será produzido. Por último e tal como já foi dito, os contaminantes biológicos são um dos perigos mais graves para o ser humano, daí a sua importante determinação.

Tabela 2 - Métodos de avaliação necessário para cada tipo de matéria-prima

Matéria-prima	Métodos		
	Inspeção visual	Prova	Análises / Avaliação do fornecedor
Açúcar	Aspetto e impurezas	Sabor	Teor de humidade e contaminantes biológicos
Cacau em pó			Teor de humidade e gordura, pH e contaminantes biológicos
Leite e derivados			Teor de humidade e gordura e contaminantes biológicos
Manteiga de cacau		Sabor & Odor	Ácidos gordos livres e contaminantes biológicos
Pasta de cacau			Teor de humidade e gordura, pH e contaminantes biológicos

Por outro lado, conhecer o fornecedor, o seu método de produção e o seu controlo de qualidade influencia o grau de avaliação das matérias-primas, aquando da sua receção. De facto, o envio por parte do fornecedor de um certificado de análises correspondente a cada lote entregue simplifica a tarefa do recetor e reduz a inspeção ao mínimo (Minifie, 2012).

Finalmente, é fundamental realizar uma avaliação aos materiais de embalagem. Em relação ao rótulo, é importante verificar se o texto, as cores, a qualidade de impressão, o código de barras e a dimensão estão em conformidade com o estipulado com a gráfica. Contudo, atualmente, o aspeto mais importante a ter em conta é o texto que inclui os ingredientes do produto, mais concretamente os alergénios, dado que é um dos perigos mais frequente. Assim, toda a informação deve ser revista à priori para aquando da receção do material de embalagem, este esteja de acordo com a legislação e não tenha erros.

Além disso, caso o material entre em contacto direto com o produto final, como por exemplo o alumínio, deve ser pedido ao fornecedor um certificado que demonstre que este está de acordo com a legislação europeia e que pode ser utilizado. No caso das cartolinas, utilizadas nas tabletes de chocolate, pode ser necessário realizar ensaios de flexão, para perceber a forma como o material se dobra durante embalamento. Caso as dobras não sejam bem feitas, a tablete de chocolate não será embalada de forma adequada, podendo levar à sua posterior contaminação.

2.3.2.2. Controlo do processo de fabrico

Durante todo o processo de fabrico, existem parâmetros fundamentais para a produção de chocolate, que também influenciam a qualidade do produto final. Com base em todo o processo de produção de chocolate apresentado e aprofundado na secção anterior, é possível reunir todos os parâmetros que devem ser controlados em cada uma das etapas. Excluindo a colheita, a fermentação e a secagem dos

grãos de cacau, encontram-se apresentados na Tabela 3, os parâmetros que devem ser controlados, quer na produção de pasta de cacau, manteiga de cacau e cacau em pó, quer na produção de chocolate propriamente dita.

Tabela 3 - Parâmetros a controlar em cada etapa do processo de produção de chocolate

Etapa		Parâmetros
Produção de pasta e manteiga de cacau de cacau em pó	Limpeza	Grau de pureza
	Torrefação	Temperatura, tempo e velocidade de agitação
	Descasque	Volume e velocidade de ar
	Moagem	Temperatura e granulometria das partículas
	Alcalinização	Temperatura e solução alcalina
	Prensagem	Tempo e teor de gordura inicial e final
	Trituração e Pulverização	Granulometria das partículas
	Filtração e Desodorização	Teor de gordura
Produção de chocolate	Mistura	Temperatura, tempo e velocidade de agitação
	Refinação	Granulometria das partículas
	Conchagem	Temperatura, tempo e velocidade de agitação
	Temperagem	Temperatura e granulometria das partículas
	Acabamento	Moldação
		Deposição do chocolate e agitação dos moldes
		Revestimento
	Drageamento	Vibração da rede, volume e velocidade de ar e temperatura de refrigeração
		Velocidade de agitação e temperatura e humidade de ar
		Embalamento
	Armazenamento	Calibração do detetor de metais e da balança
		Temperatura e humidade

Apesar da necessidade de controlo em todas as etapas do processo de fabrico de chocolate, o departamento do controlo de qualidade não pode estar sempre a inspecionar se todos os parâmetros estão a ser cumpridos e por isso, deve existir uma comunicação com o departamento de produção e de manutenção das máquinas. Por outro lado, a implementação do plano HACCP permite-nos identificar as etapas cujo perigo associado não é possível eliminar ou reduzir à posteriori (PCC's) (Minifie, 2012).

Desta forma, é possível concluir que o embalamento é um PCC pelo simples facto desta etapa incorporar um detetor de metais. Os metais e os alumínio são um dos perigos físicos mais severos, pois podem causar lesões ou mesmo constituir um risco à vida do consumidor e estão associados a defeitos de fabrico ou degradação dos equipamentos ou até a práticas de fabrico incorretas. Assim, a presença do detetor de metais no fim da linha de produção é a única forma de impedir a existência destes

contaminantes no chocolate e o departamento do controlo de qualidade deve realizar uma avaliação ao produto descartado, de forma a perceber se alguma peça ou equipamento se está a desfazer.

Por outro lado, a etapa de embalagem ainda inclui uma balança que permite verificar se o chocolate possui o peso pretendido. Se o produto tiver excesso de peso, então haverá uma redução dos lucros e se o produto estiver abaixo do peso, o cliente estará a ser enganado, o que constitui um delito legal (Minifie, 2012). As variações de peso no produto estão normalmente relacionadas com pequenas falhas durante a moldação de tabletes ou com falhas humanas na programação do equipamento de enchimento de drageias. Assim, o departamento do controlo de qualidade deve realizar uma análise organolética e eventualmente uma análise microbiológica a uma amostra do chocolate abaixo do peso pretendido, para que este possa ser mais tarde ser reaproveitado.

2.3.2.3. Inspeção do produto acabado

Se a avaliação das matérias-primas e dos materiais de embalagem e o controlo do processo de fabrico foi realizado corretamente, então nenhuma inspeção deveria ser necessária. Porém, esta situação de não inspeção é uma utopia, pois mesmo nas melhores empresas há falhas ocasionalmente, sendo necessário inspecionar o produto acabado. O problema é decidir qual o nível mínimo de inspeção, pois no final da linha de produção podem ser embaladas centenas de peças por minuto. Assim, as verificações mais importantes durante a inspeção do produto acabado são a aparência, o sabor, o peso e a marcação da validade e do lote na embalagem (Minifie, 2012).

Em relação à aparência e sabor, a equipa do departamento do controlo de qualidade que realiza a inspeção deve conhecer exatamente o produto que foi aprovado pelo departamento de marketing, de maneira a facilitar a verificação do produto em questão. Quanto ao peso e tal como já foi dito, deve existir um controlo exigente, para que não haja prejuízo para a própria empresa, nem para o cliente. Por último, a marcação da validade e do lote na embalagem não pode ter erros, porque o cliente deve estar devidamente informado sobre qual o prazo de validade do produto e porque o lote permite identificar o momento de fabrico do produto e consequentemente quais as matérias-primas usadas.

Apesar de não ser prioritária, uma vez que existiu um controlo durante todo o processo de fabrico de chocolate, a análise microbiológica deve ser realizada de forma aleatória ou caso se suspeite de uma contaminação. É de notar que o produto final pode estar contaminado, mesmo que o sabor e aparência estejam satisfatórias, pois ao contrário da carne, peixe e outros alimentos perecíveis, os microrganismos na maioria dos produtos de confeitaria permanecem dormentes à temperatura ambiente, como resultado da baixa atividade da água (Minifie, 2012)

Finalmente, o departamento do controlo de qualidade deve resolver todas as reclamações que possam surgir por parte do cliente. Por norma, as queixas estão relacionadas com sabores estranhos, como o ranço, sendo necessário realizar análises às amostras existentes do lote da reclamação, para determinar a real causa do problema. Uma das causas mais comuns é o não correto acondicionamento do produto durante o transporte, após saída da fábrica, fazendo com que este se deteriore.

Capítulo 3. Pesquisa de técnicas alternativas às análises de rotina

Neste capítulo é apresentada a metodologia de trabalho desta dissertação, dividindo-se em duas partes: **Análises de rotina: situação atual** e **Propostas alternativas às análises de rotina**. Primeiramente, são apresentadas as análises de rotina atualmente utilizadas no controlo de qualidade da Imperial e depois é exposto um conjunto de técnicas alternativas para essas análises de rotina.

3.1 Análises de rotina: situação atual

Semanalmente, no laboratório do controlo de qualidade da Imperial efetuam-se várias análises em alguns produtos, nomeadamente análises microbiológicas, que se focam na contagem total de microrganismos, contagem de bolores e leveduras e pesquisa de bactérias coliformes, e análises físico-químicas, que consistem na determinação do teor de gordura e humidade. Por último, a Imperial recorre a laboratórios externos para contagem de *E. coli* e pesquisa de *Salmonella* e também para detetar a presença de micotoxinas, alergénios e açúcar em alguns produtos.

3.1.1. Análises microbiológicas

3.1.1.1. Contagem total de microrganismos

O método utilizado nesta análise microbiológica baseia-se na norma ISO 4833:1991 (International Organization for Standardization, 1991) e tem como principal objetivo a determinação do número de microrganismos presentes em matérias-primas, produto em curso de fabrico ou produto acabado, através da contagem do número de colónias num meio de cultura sólido, após incubação a 30 °C. Na Figura 15 encontram-se as principais etapas deste procedimento, que será apresentado em pormenor.

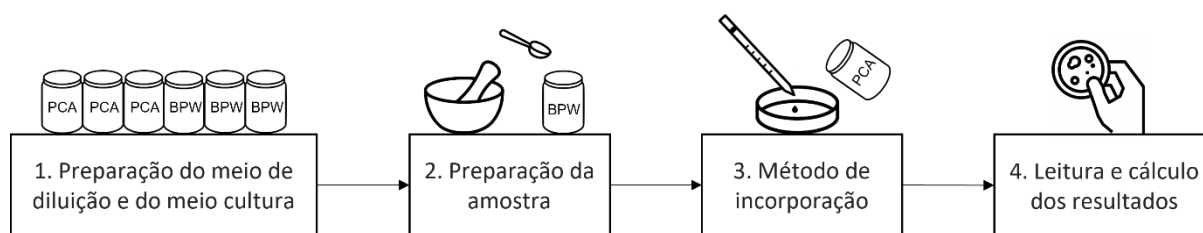


Figura 15 - Etapas genéricas do método de contagem total de microrganismos.

Em primeiro lugar, é necessário preparar os meios de diluição e cultura usados neste procedimento e para tal, basta seguir as instruções dadas pelo fabricante na respetiva embalagem. Em relação ao meio de diluição, utiliza-se o BPW (*Buffered Peptone Water*) que é inicialmente dissolvido em água destilada, numa proporção de 20 g para 1 000 mL. De seguida, distribui-se 90 mL desta mistura por frascos e

9 mL por tubos de ensaio de 16 mm x 160 mm, que são posteriormente esterilizados no autoclave durante 15 min a 121 °C. Em relação ao meio de cultura, a Imperial utiliza o PCA (*Plate Count Agar*) que é preparado de forma similar. Assim, numa proporção de 23,5 g para 1 000 mL, dissolve-se este meio em água destilada, sendo necessário aquecer a solução até ao ponto de ebulição para que ocorra dissolução completa. Por fim, é colocado em frascos que são também esterilizados no autoclave.

Em segundo lugar, é essencial diluir o produto que se pretende analisar duas ou mais vezes, pois caso este contenha microrganismos, as suas colónias podem invadir a superfície, não permitindo uma correta contagem. É de notar que esta etapa é realizada à chama, para que o ambiente envolvente esteja esterilizado e todos os utensílios necessários são desinfetados com álcool 70 %. Assim, com a ajuda de uma faca ou de uma colher e um conjunto almofariz-pilão, a amostra que se pretende analisar é cortada ou partida em pedaços mais pequenos, de maneira a facilitar a diluição e logo de seguida, pesam-se 10 g desse produto para um dos frascos com 90 mL de BPW, correspondendo à primeira diluição (1/10). Para uma segunda diluição (1/100), basta utilizar uma pipeta esterilizada e colocar 1 mL do frasco da diluição 1/10 num dos tubos de ensaio de 16 mm x 160 mm que contém 9 mL de BPW.

Em terceiro lugar, realiza-se a técnica de incorporação em duplicado para cada diluição efetuada anteriormente e tal como a etapa anterior, esta é realizada à chama, para que o ambiente envolvente esteja esterilizado. Assim, transfere-se 1 mL da amostra correspondente à diluição 1/10, com uma pipeta estéril, para cada uma das duas placas de Petri estéreis e com uma nova pipeta estéril retira-se 1 mL da amostra correspondente à diluição 1/100 e coloca-se em cada uma das outras duas placas de Petri estéreis. Seguidamente, coloca-se cerca de 15 mL de PCA em cada uma das placas de Petri, mistura-se cuidadosamente o inóculo com o meio e deixa-se a mistura numa superfície horizontal fria, para esta solidificar. Por último, inverte-se e incuba-se as placas numa estufa a 30 °C durante 72 h.

Finalmente, dependendo do número de colónias obtidas em cada placa é necessário calcular o resultado obtido. Assim, considerando que a contagem de UFC é normalizada para 1 g de amostra analisada, então o resultado é expresso como UFC=1000/g, por exemplo. Caso as duas placas correspondentes a uma diluição não apresentem uma única colónia, o resultado deve ser apresentado da seguinte forma: $< 1 \times d^{-1}$, onde d é o fator de diluição usado. Caso as duas placas contenham menos de 15 colónias, então o resultado corresponde à média aritmética das colónias contadas nas duas placas e caso estas contenham entre 15 e 300 colónias, então o resultado obtido é dado pela Equação (1).

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \cdot d} \quad (1)$$

onde $\sum C$ é a soma das colónias contadas nas placas usadas, n_1 é o número de placas selecionadas na primeira diluição, n_2 é número de placas usadas na segunda diluição e d é o fator de diluição usado na primeira diluição.

3.1.1.2. Contagem de bolores e leveduras

Relativamente à contagem de bolores e leveduras, este método baseia-se na norma ISO 7954:1987 (International Organization for Standardization, 1987) e é muito semelhante ao método de contagem total de microrganismos, apresentado na secção anterior. Este tem como principal objetivo a determinação do número de bolores e leveduras presentes em matérias-primas, produto em curso de fabrico ou produto acabado, através da contagem do número de colónias num meio de cultura sólido, após incubação a 25 °C.

Tal como no método apresentado anteriormente, primeiro é necessário preparar os meios de diluição e cultura usados neste procedimento, seguindo as instruções dadas pelo fabricante na respetiva embalagem. O meio de diluição usado continua a ser o mesmo, o BPW, e este é preparado da mesma forma como descrito anteriormente na secção 3.1.1.1., mas neste caso apenas se preparam frascos de 90 mL, pois apenas será realizada uma única diluição. Em relação ao meio de cultura, a Imperial utiliza o meio RBC (*Rose Bengal Chloramphenicol Agar*), que é dissolvido em água destilada, sendo necessário aquecer a solução até ao ponto de ebulição para que ocorra dissolução completa. Por fim, é colocado em frascos que são também esterilizados no autoclave durante 15 min a 121 °C.

De seguida, o produto que se pretende analisar é diluído apenas uma vez (1/10), pois não é costume haver tanto crescimento de bolores e leveduras nas placas. Esta etapa é realizada à chama, tal como descrito no método anterior apresentado na secção 3.1.1.1., havendo também a homogeneização da amostra que se pretende analisar.

Posteriormente, realiza-se a técnica de incorporação em duplicado, tal como descrito na secção 3.1.1.1., colocando 1 mL da amostra diluída e cerca de 15 mL de RBC nas duas placas de estéreis necessárias. Por último, inverte-se e incuba-se as placas numa estufa a 25 °C durante cerca de 5 dias.

Por fim e considerando apenas um número de colónias obtidas inferior a 150 em cada placa, é necessário calcular o resultado obtido e mais uma vez, a contagem de UFC é normalizada para 1 g de amostra analisada. Caso as duas placas correspondentes à única diluição feita não apresentem uma única colónia, o resultado deve ser apresentado da seguinte forma: < 10 . Caso as duas placas contenham menos de 150 colónias, então o resultado obtido é dado pela Equação (1) já apresentada anteriormente, mas n_2 é considerado nulo.

3.1.1.3. Pesquisa de bactérias coliformes

Antes de mais, é de notar que coliformes são bactérias que a uma determinada temperatura, ou seja 30 °C, causam a fermentação da lactose havendo formação de gás. Assim, este método baseia-se na NP 2164 (Instituto Português da Qualidade, 1983) e tem como objetivo a pesquisa de coliformes em matérias-primas, produto em curso de fabrico ou produto acabado, após incubação a 30 °C. Na Figura 16 encontram-se as etapas deste procedimento, que será explicado em pormenor.

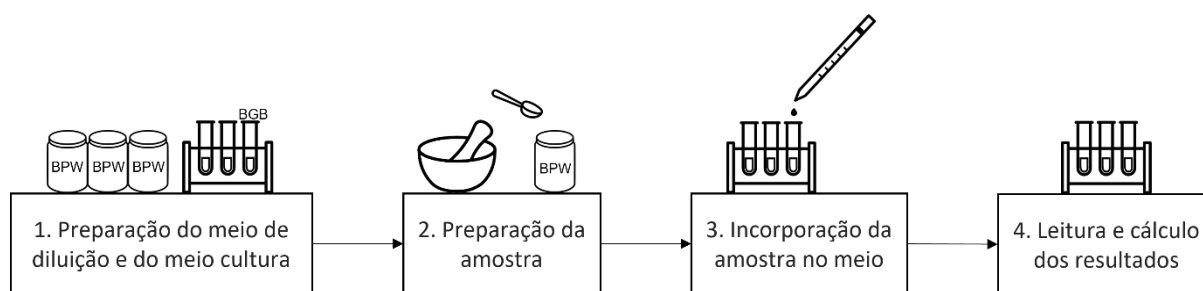


Figura 16 - Etapas genéricas do método de pesquisa de bactérias coliformes.

Este método começa com a preparação dos meios de diluição e cultura, tal como nos dois métodos anteriores, sendo aconselhável seguir as instruções dadas pelo fabricante na respetiva embalagem. O meio de diluição usado continua a ser o mesmo, o BPW, que é preparado da mesma forma como o método descrito na secção 3.1.1.1., mas neste caso apenas se preparam frascos de 90 mL, pois apenas será realizada uma única diluição. Em relação ao meio de cultura, a Imperial utiliza o BGB (*Brilliant Green Bile Broth*), ou mais comumente chamado de verde brilhante. Assim, prepara-se um meio de concentração simples dissolvido em água destilada, numa proporção de 40,01 g para 1 000 mL, e coloca-se 10 mL em tubos de ensaio de 16 mm x 160 mm. De seguida, prepara-se um meio de concentração dupla também dissolvido em água destilada, numa proporção de 80,02 g para 1 000 mL e desta vez coloca-se 10 mL em tubos de ensaio de 20 mm x 200 mm. Ambos os tubos devem conter um tubo de Durahm dentro. Todos estes tubos são também esterilizados no autoclave durante 15 min a 121 °C.

Após a preparação dos meios, a etapa seguinte é realizada à chama, para que o ambiente envolvente esteja esterilizado e todos os utensílios necessários são desinfetados com álcool 70 %. Com uma pipeta estéril coloca-se 10 mL da amostra que se pretende analisar no tubo de ensaio correspondente ao meio de concentração dupla e 1 mL no tubo de ensaio correspondente ao meio de concentração simples. Mistura-se bem para evitar a inclusão de bolhas de ar e por fim, os dois tubos são incubados numa estufa a 30 °C durante 48 h.

Em relação aos resultados obtidos, apenas é necessário observar os tubos de ensaio e verificar se há turvação e formação de gás no tubo de Durahm, devendo o gás atingir pelo menos 1/10 da altura do tubo. Caso o resultado seja positivo, este é apresentado como positivo em 1 g, caso sendo o resultado seja negativo, este é apresentado como negativo em 1 g.

3.1.1.4. Contagem de *E. coli*, pesquisa de *Salmonella* e outras análises

Para além das análises microbiológicas já mencionadas, a Imperial envia, periodicamente, amostras das suas matérias-primas e produtos acabados para laboratórios externos de forma a detetar a presença de microrganismos patogénicos, como por exemplo *E. coli* e *Salmonella*. No passado, a empresa já realizou estas análises nas suas instalações, mas com receio que ocorra uma contaminação e esta se alastre por várias zonas, acabou por optar por realizá-las em laboratório externo. Para a contagem de *E. coli* e para pesquisa de *Salmonella*, estes laboratórios utilizam, respetivamente, a norma ISO 16649-2:2001 e ISO 6579-1:2017.

3.1.2. Análises físico-químicas

3.1.2.1. Determinação do teor de gordura

Relativamente ao método de determinação do teor de gordura usado (extração por Soxhlet), este baseia-se na NP 1719 (Instituto Português da Qualidade, 1981) e pode ser aplicado no cacau e produtos derivados. Na Imperial, este método é mais utilizado na pasta de cacau, pois a gordura presente nesta matéria-prima influencia a qualidade final do chocolate. Porém, também pode ser utilizado em produtos em curso de fabrico, como a torta de cacau, e em produtos acabados de chocolate.

Assim, a extração por Soxhlet consiste na utilização de um solvente que é continuamente submetido a ciclos por ebulição e condensação através da matriz, onde a amostra é recolhida quando o solvente está quente. Na Figura 17 encontram-se as etapas genéricas deste método utilizado, que será agora apresentado em detalhe.

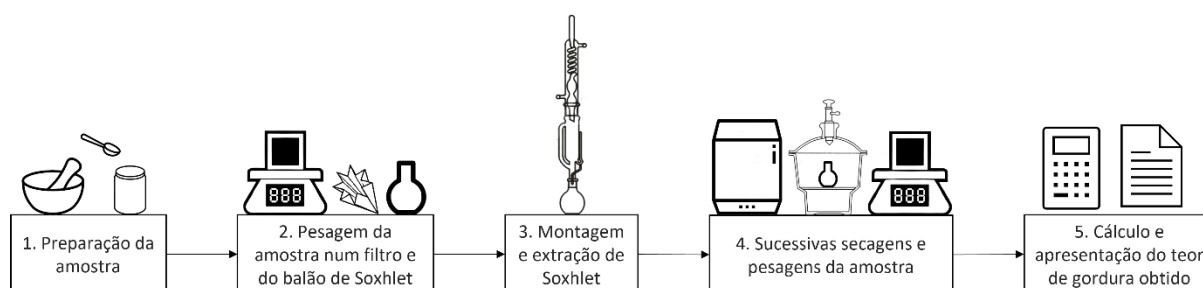


Figura 17 - Etapas genéricas do método de determinação do teor de gordura.

Em primeiro lugar, é necessário preparar a amostra que se pretende analisar. Caso a amostra seja os grãos de cacau, da amostra homogeneizada são retiradas 10 g, que são trituradas quanto possível sem se formar a pasta de cacau, guardando-se num recipiente hermético. Caso a amostra seja um pó (ex. cacau ou chocolate em pó), basta apenas que esta seja homogeneizada com uma vareta de vidro e guardada num recipiente hermético. Caso a amostra seja facilmente fundível (ex. pasta de cacau e chocolate), esta pode ser arrefecida e desagregada por raspagem e triturada tanto quanto possível com o recurso a uma faca e a uma tábua de corte, sendo de seguida guardada num recipiente hermético ou pode ser fundida e diretamente colocada num recipiente hermético. Caso a amostra seja um produto duro (ex. torta de cacau), esta deve ser triturada, de forma a que as partículas resultantes não excedam a dimensão de 150 μm e também guardada num recipiente hermético.

De seguida, pesa-se 3 a 5 g da amostra (m) diretamente para um filtro de pregas e pesa-se um balão de Soxhlet (p_1), previamente seco na estufa a $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e arrefecido em exsiccador, numa balança com precisão de $\pm 0,0001$ g. O balão de Soxhlet é posto na manta de aquecimento com esferas de vidro do equipamento e o filtro de pregas com a amostra é introduzido num cartucho de extração, que por sua vez é tapado com algodão e colocado na alonga de Soxhlet. Por fim, o equipamento é montado, utilizando vaselina nas junções e apertando as garras. Logo a seguir, enche-se duas vezes a alonga de Soxhlet com éter de petróleo, liga-se a manta de aquecimento e abre-se a torneira de água gelada, necessária para o arrefecimento.

A extração é deixada a ocorrer durante cerca de 40 h, mas caso se saiba que a amostra possui baixo teor de gordura, como por exemplo a torta de cacau com 10-12 %, basta deixar apenas 24 h. Na Figura 18, é possível observar o equipamento de Soxhlet montado, no momento em que ocorre a extração.



Figura 18 - Equipamento de Soxhlet montado, durante a extração.

Após o tempo de extração, desmonta-se o equipamento, remove-se e descarta-se o cartucho de extração, volta-se a fazer a montagem e espera-se que o éter de petróleo suba para a alonga de Soxhlet. Desmonta-se novamente o equipamento, para que seja possível retirar e armazenar a maior parte deste solvente, podendo ser necessário repetir este procedimento vários vezes.

Por fim, o balão de Soxhlet é colocado na estufa a $(102 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por períodos sucessivos de 1 h, arrefecendo 30 min em exsiccador e depois é pesado, até à obtenção de um peso igual ou superior ao imediatamente anterior. Quanto ao teor de gordura total do produto, este é expresso em percentagem com uma aproximação às décimas e é calculado através da Equação (2).

$$MG/\% = \frac{p - p_1}{m} \cdot 100 \quad (2)$$

onde m é a massa, em g, da amostra, p é o menor peso, em g, do balão com matéria gorda após as secagens sucessivas e p_1 é o peso, em g, do balão.

3.1.2.2. Determinação do teor de humidade

Na Imperial, o método de determinação de humidade baseia-se no método gravimétrico e é utilizado maioritariamente para confirmar se as matérias-primas estão de acordo com as especificações dadas pelo fornecedor e para determinar o teor de humidade dos chocolates produzidos. Na Figura 19 encontram-se as etapas genéricas deste método, que será posteriormente explicitado em pormenor.

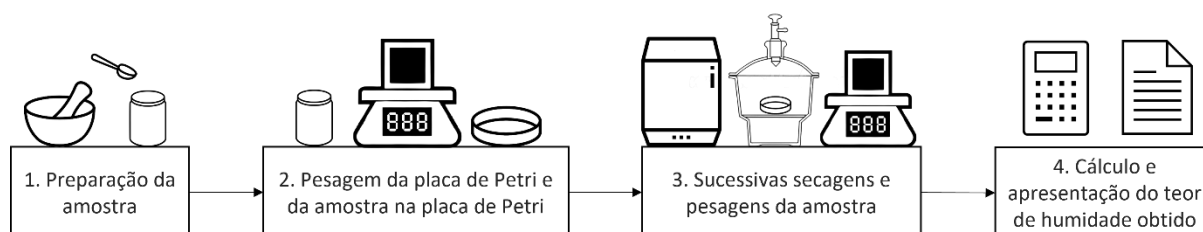


Figura 19 - Etapas genéricas do método de determinação do teor de humidade.

Para a determinação do teor de humidade de matérias-primas, exceto o cacau e seus derivados, a amostra começa por ser homogeneizada com uma vareta de vidro e guardada num recipiente hermético. De seguida, é necessário secar uma placa de Petri, com a tampa ao lado, numa estufa a $(102 \pm 1) ^\circ\text{C}$ durante 1 h e deixá-la arrefecer em exsiccador durante 30 min. Posteriormente, a placa de Petri é pesada (m_0) e, sem tarar, introduzem-se cerca de 3 g de amostra que se pretende analisar (m_1), numa balança com uma precisão de $\pm 0,0001$ g. Após esta pesagem, a placa de Petri com amostra é colocada novamente na estufa a $(102 \pm 1) ^\circ\text{C}$, com a tampa ao lado, mas desta vez durante 2 h, é também arrefecida em exsiccador durante 30 min e volta a ser pesada. Por fim, a placa é novamente colocada na

estufa por períodos sucessivos de 1 h, arrefecendo 30 min em exsicador e depois é pesada, até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não exceda 0,0005 g ou até que a massa aumente, considerando-se m_2 como a massa da penúltima pesagem.

Para a determinação do teor de humidade do cacau e seus derivados, a preparação da amostra é igual à do método de determinação da gordura. Caso a amostra se encontre no estado sólido (ex. pasta de cacau), esta deve ser desagregada por raspagem, através do uso de uma faca e uma tábua de corte, e guardada num recipiente hermético. Caso a amostra seja um pó (ex. cacau ou chocolate em pó), basta apenas que esta seja homogeneizada com uma vareta de vidro e guardada num recipiente hermético.

De seguida, seca-se uma placa de Petri, com a tampa ao lado, numa estufa a $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durante 1 h e depois esta deve arrefecer em exsicador durante 30 min. Posteriormente, a placa de Petri é pesada (m_0) e, sem tarar, introduzem-se cerca de 5 g de amostra que se pretende analisar (m_1), numa balança com precisão de $\pm 0,0001$ g. O conteúdo da placa é homogeneizado com uma vareta de vidro e a placa de Petri é colocada novamente na estufa a $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$, com a tampa ao lado. Após 4 h de secagem, é necessário arrefecer em exsicador durante 30 min e volta-se a pesar. Por fim, a placa é novamente colocada na estufa por períodos sucessivos de 1 h, arrefecendo 30 min em exsicador e depois é pesada, até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não exceda 0,002 g, considerando-se m_2 como a massa da penúltima pesagem.

Independentemente do tipo de amostra que se pretende analisar, o teor de humidade, expresso em percentagem com uma aproximação às décimas, é calculado através da Equação (3).

$$H/\% = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad (3)$$

onde m_0 é a massa, em g, da placa de Petri e respetiva tampa, m_1 é a massa, em g, da placa de Petri e respetiva tampa, com a amostra que se pretende analisar e m_2 é a massa, em g, da placa de Petri e respetiva tampa, com a amostra após secagem.

Apesar do teor de humidade depender do tipo de chocolate que se está a analisar, os resultados esperados encontram-se entre os 2 % e os 3 %. Se a amostra que se estiver a analisar for uma matéria-prima, o resultado expectável encontra-se nas fichas técnicas cedidas pelos fornecedores.

3.1.3. Análises químicas e nutricionais

3.1.3.1. Determinação de micotoxinas

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos, que incluem bolores, leveduras e cogumelos e são consideradas um perigo químico devido aos seus graves efeitos na saúde humana.

Como o chocolate não possui água suficiente para suportar o crescimento microbiano, a proliferação de fungos e a produção de micotoxinas só pode ocorrer durante o processamento dos grãos cacau, como a fermentação e secagem. Posteriormente, estes são submetidos a etapas de torra, consideradas suficientes para eliminar microrganismos, mas sabe-se que algumas micotoxinas, como as aflatoxinas e a ocratoxina A, mantêm uma certa estabilidade durante a maioria das etapas de processamento térmico de alimentos (Copetti et al., 2012).

Desta forma, a Imperial recorre a laboratórios externos para realizar esta análise a micotoxinas, que utilizam a técnica HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) que é um processo de separação em que os componentes da amostra migram através de uma coluna a velocidades diferentes devido à sua solubilidade, tamanho, carga, afinidade e polaridade, fazendo com que eluam do sistema em tempos diferentes. Estes componentes interagem entre a fase estacionária, a própria amostra e a fase móvel (Gika, Kaklamanos, Manesiotis, & Theodoridis, 2015).

Um sistema HPLC é principalmente constituído por uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna e um detetor (espectrofotómetro ou refratómetro), mas na Figura 20 é possível encontrar uma representação esquemática do sistema de todos os seus componentes.

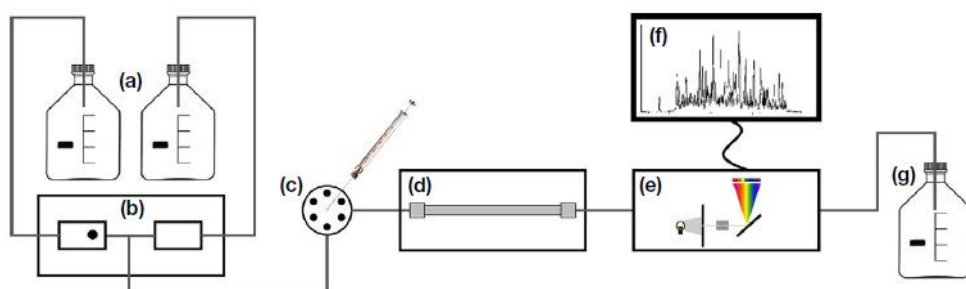


Figura 20 - Representação esquemática de um HPLC, onde: (a) compartimento do solvente; (b) bomba; (c) porta de injeção da amostra; (d) coluna; (e) detetor; (f) registo e processamento de dados e (g) desperdício (Gika et al., 2015).

Assim, o eluente (fase móvel) é aspirado por uma bomba a partir de um compartimento, fazendo-o circular por todo o sistema a uma pressão relativamente elevada. De seguida, a amostra que se pretende analisar é introduzida por uma seringa no sistema de injeção e é arrastada pelo eluente através da coluna cromatográfica que contém a fase estacionária. No final, cada composto irá eluir com um tempo de retenção característico, apresentando um pico, com maior ou menor largura de base. A área desse pico é proporcional à concentração do composto injetado e o tempo de retenção servirá para a sua identificação (Gika et al., 2015).

3.1.3.2. Determinação de alergénios

Em relação aos alergénios, estes são ingredientes ou produtos utilizados na produção de géneros alimentícios que podem provocar alergias ou intolerâncias nalgumas pessoas, constituindo um perigo para a saúde das mesmas, como por exemplo produtos à base de amendoins e/ou leite (Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2011). Assim, é necessário garantir que os chocolates cuja rotulagem não indica a presença de quaisquer alergénios, não possuam de facto nenhum vestígio e, por isso, a Imperial recorre a laboratórios externos para realizar estas análises específicas.

O método mais utilizado para deteção qualitativa e quantitativa de alergénios é o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), pois este possui um alto nível de sensibilidade e facilidade de uso. Este usa anticorpos monoclonais ou policlonais gerados em mamíferos que reconhecem proteínas selecionadas de alimentos como marcadores da presença de um alimento alergénico. O método ELISA divide-se em dois formatos, sanduíche (s-ELISA) ou competitivo (c-ELISA), dependendo de vários fatores, como a matriz alimentar, a sensibilidade desejada e as características do anticorpo selecionado e do analito alvo. Para além disso, estes dois formatos podem ser diretos ou indiretos, dependendo se o anticorpo detetor é ou não, respetivamente, marcado com uma enzima (Sharma, Khuda, Parker, Eischeid, & Pereira, 2016). Na Figura 21 é possível observar a diferença entre estes dois métodos.

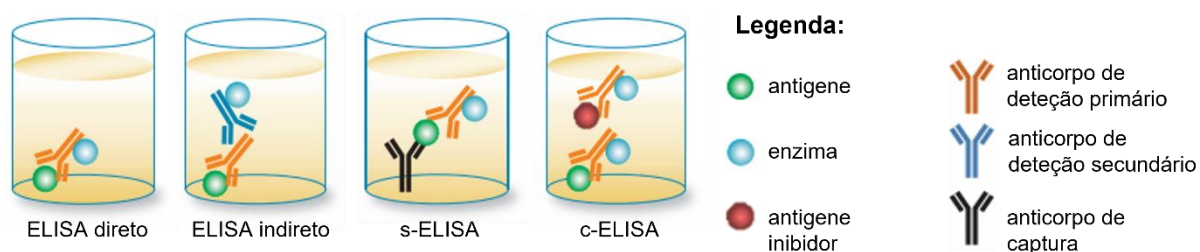


Figura 21 - Diferença entre os diferentes métodos ELISA disponíveis (Adaptado de HHUB, 2021).

De uma maneira geral, o método ELISA começa com a imobilização do antígeno ou do anticorpo de captura numa placa de 96 poços. De seguida, lava-se a placa e adiciona-se um tampão para bloquear locais livres nos poços. A partir desta etapa e dependendo do método que se está a usar, é necessário adicionar o anticorpo de deteção primário e/ou conjugado com a enzima, lavando a placa entre as várias etapas. Por fim, adiciona-se uma solução de substrato e incuba-se a placa. Caso a cor se desenvolva, o resultado do teste é positivo, o que significa que ocorreu reação entre o antígeno e o anticorpo, havendo a presença da enzima em questão. Para além da sua deteção, é possível quantificar a sua presença e para isso basta adicionar uma solução *stop* para interromper a reação, quando a cor estiver suficientemente desenvolvida, e medir a absorvância a 450 nm, num espectrofotómetro. Esta medição

permite, posteriormente, calcular a concentração da enzima presente na amostra testada, através de uma curva de calibração (Sharma et al., 2016).

Para além deste, alguns laboratórios também utilizam o método PCR (*Polymerase Chain Reaction*), um método utilizado para amplificar, isto é, copiar pequenas quantidades de DNA muitas vezes. Para tal, utiliza-se um equipamento designado termociclador que permite a programação de três modos, para que ocorram as etapas de desnaturação, anelamento e extensão. Na Figura 22 encontram-se as três etapas principais do método PCR.

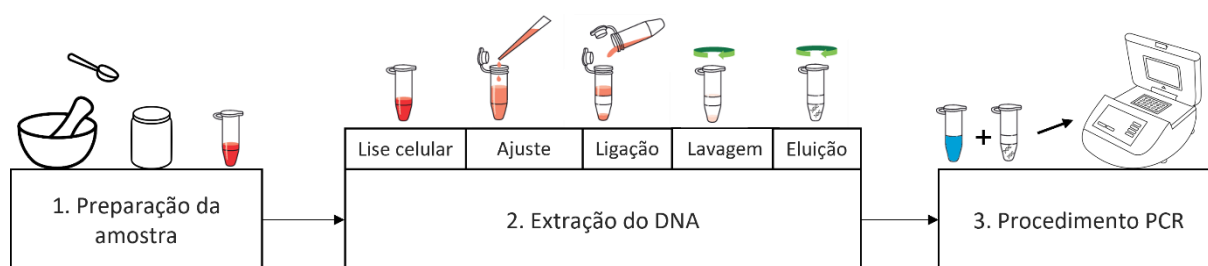


Figura 22 - Etapas do método PCR.

De forma simplificada, o método PCR começa com a homogeneização, pesagem e diluição da amostra que se pretende analisar. Depois, durante a etapa de extração do DNA, realiza-se a lise celular, adicionando um tampão à amostra que é depois colocada em incubação. Ajusta-se as condições e só depois se realizam as etapas de ligação, lavagem e eluição, cujos protocolos dependem do objetivo da análise. Por fim, realiza-se o procedimento PCR propriamente dito, que envolve a combinação da amostra de DNA com uma mistura de primers (DNA específico para o gene que se quer estudar), desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) e a enzima DNA-polimerase num tampão (Hoy, 2013).

Esta última etapa divide-se em três passos: desnaturação, anelamento e elongação. A desnaturação corresponde à etapa em que se coloca a mistura no termociclador, a uma temperatura de cerca de 94 °C durante 20 s, havendo separação das duas cadeias de DNA. De seguida, diminui-se a temperatura para cerca de 55 °C que é mantida por mais 20 s, ocorrendo o anelamento, em que um par de primers se liga à sua zona complementar, em cada uma das duas cadeias separadas. Em terceiro lugar, ocorre a elongação, isto é, a DNA-polimerase vai adicionando as bases complementares (dNTPs), formando uma nova tira. Este processo dá-se a uma temperatura de 72 °C durante 30 s (Hoy, 2013).

Finalmente, repete-se este procedimento cerca de 35 a 45 vezes, até que o DNA tenha sido amplificado vezes suficientes para que seja possível detetar uma sequência específica. Atualmente já foram feitas várias modificações a este método PCR e o mais conhecido é o PCR em tempo real, em que

se usam termocicladores de detecção de fluorescência, que amplificam sequências específicas e medem a sua concentração simultaneamente (Hoy, 2013).

3.1.3.3. Determinação de açúcares

Outra análise que pode ser necessária efetuar é a determinação da quantidade de açúcares em produtos de chocolate. Nos últimos anos, têm surgido cada vez mais chocolates com elevadas percentagens de cacau, cuja adição de açúcar é quase nula. Porém, como na mesma unidade fabril podem ser produzidas vários tipos de chocolate, é fundamental realizar análises que garantam que foi realizada uma limpeza adequada entre os diferentes produtos, não existindo por isso resíduos de açúcar.

Assim, a Imperial recorre a laboratórios externos para determinar a quantidade de açúcares presentes em chocolate cuja quantidade deve ser quase nula. Alguns dos açúcares analisados são a sacarose, a D-glicose e a D-frutose, mas geralmente pretende-se analisar a quantidade de açúcares totais, sem diferenciação. Para esta análise, os laboratórios externos utilizam o método HPLC, tal como na determinação de micotoxinas.

3.2. Propostas alternativas às análises de rotina

Depois de todas as análises de rotina terem sido detalhadas, são agora apresentadas todas as alternativas encontradas. Numa fase inicial do estágio, foi necessário estudar em pormenor todas as análises de rotina, de forma a perceber quais as suas principais limitações. De um modo geral, as análises atualmente usadas requerem muito tempo de preparação e execução e a apresentação dos resultados também é demorada. Consequentemente, pretende-se que as alternativas sejam mais rápidas e, se possível, que não sejam mais caras que os métodos atuais, sendo também necessário incluir possíveis custos de investimento nas propostas alternativas.

3.2.1. Alternativas propostas: análises microbiológicas

3.2.1.1. Técnica de espalhamento da superfície

O controlo de qualidade da Imperial, tal como já foi apresentado, baseia-se na norma ISO 4833:1991 para a contagem total de microrganismos e baseia-se na norma ISO 7954:1987 para contagem de bolores e leveduras. No entanto, estas normas já foram substituídas por outras mais recentes, sendo por isso importante conhecer quais os motivos para as atualizações efetuadas.

A norma ISO 4833:1991 foi substituída pela norma ISO 4833:2003, mas ambas expõem o método de contagem total de microrganismos, através da técnica de incorporação. Por sua vez, esta também foi substituída pelas mais recentes normas ISO 4833-1:2013, que apresenta o método através da técnica

de incorporação e ISO 4833-2:2013, que se refere ao método através da técnica de espalhamento da superfície. Assim, apenas passou a existir uma nova norma cujo método utiliza a técnica de espalhamento da superfície, sendo na mesma possível usar qualquer uma das técnicas.

O mesmo não acontece com a norma ISO 7954:1987 que foi substituída pelas mais recentes normas ISO 21527-1:2008 e ISO 21527-2:2008, que se diferenciam pelo tipo de produto que se pretende analisar. A norma ISO 21527-1:2008 expõe o método de contagem de colónias em produtos com atividade de água (a_w) superior a 0,95, enquanto a norma ISO 21527-2:2008 expõe o método para produtos com atividade de água (a_w) menor ou igual a 0,95. Porém, estas duas partes da norma ISO 21527:2008 passam a apresentar o método utilizando a técnica de espalhamento da superfície e não a técnica de incorporação utilizada na norma ISO 7954:1987.

Assim, como o chocolate possui um valor a_w entre 0,5 e 0,6 (Talbot, 2009), é necessário estudar a norma ISO 21527-2:2008 (International Organization for Standardization, 2008). Na Figura 23 são apresentadas as etapas genéricas deste método de contagem de bolores e leveduras que utiliza a técnica de espalhamento da superfície, que será agora apresentado em detalhe.

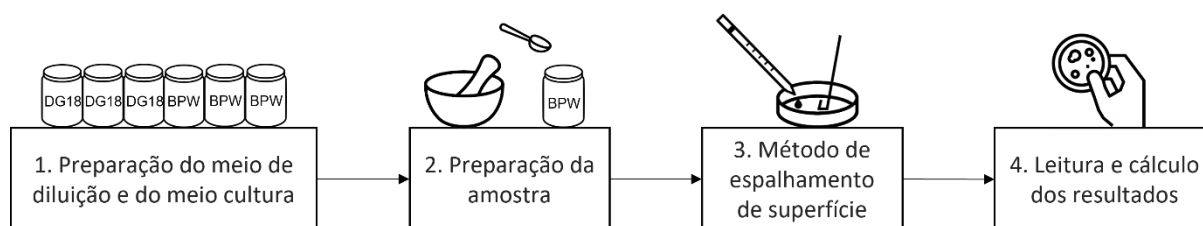


Figura 23 - Etapas genéricas do método atualizado de contagem de bolores e leveduras.

Em primeiro lugar, é necessário preparar os meios de diluição e cultura usados neste procedimento. O meio de diluição pode continuar a ser o mesmo, o BPW que é dissolvido em água destilada, numa proporção de 20 g para 1 000 mL que é de seguida, distribuído por frascos, numa quantidade de 90 mL cada e que são posteriormente esterilizados no autoclave durante 15 min a 121 °C. Em relação ao meio de cultura, a norma ISO 21527-2:2008 indica que se deve utilizar o DG18 (*Dichloran 18 % glycerol agar*) que é então dissolvido em água destilada, sendo necessário aquecer a solução até ao ponto de ebulição para que ocorra dissolução completa. Por fim, é colocado em frascos que são também esterilizados no autoclave durante 15 min a 121 °C.

De seguida, o produto que se pretende analisar é diluído apenas uma vez, porque não haverá muito crescimento de bolores e leveduras nas placas. Esta etapa é realizada à chama, para que o ambiente envolvente esteja esterilizado e todos os utensílios necessários são desinfetados com álcool 70 %. Assim,

a amostra que se pretende analisar é cortada ou partida em pedaços mais pequenos com a ajuda de uma faca ou de uma colher e um conjunto almofariz-pilão, de maneira a facilitar a diluição e logo de seguida, pesam-se 10 g desse produto para um dos frascos com 90 mL de BPW, correspondendo à única diluição realizada (1/10).

Posteriormente, com todo o ambiente envolvente esterilizado por uma chama, coloca-se com uma pipeta estéril cerca de 15 mL de DG18 em duas placas de Petri também estéreis (duplicado) e deixa-se o meio solidificar numa superfície horizontal fria. Depois, com uma pipeta estéril, coloca-se 1 mL da amostra correspondente à única diluição feita em cada uma das duas placas e espalha-se o líquido sobre a superfície da placa com um espalhador estéril, até que este seja completamente absorvido pelo meio. Por último, incuba-se as placas na sua posição correta numa estufa a 25 °C durante 5 dias.

Por fim, os resultados são apresentados e calculados com recurso à ISO 7218:2007, mas nada foi alterado. Assim, considerando apenas um número de colónias obtidas inferior a 150 em cada placa, é necessário calcular o resultado obtido, considerando que a contagem de UFC é normalizada para 1 g de amostra analisada. Caso as duas placas correspondentes à única diluição feita não apresentem uma única colónia, o resultado deve ser apresentado da seguinte forma: < 10 . Caso as duas placas contenham menos de 150 colónias, então o resultado obtido é dado pela Equação (1) já apresentada anteriormente, mas n_2 é considerado nulo.

3.2.1.2. Placas Compact Dry

Como alternativa aos métodos apresentados para contagem total de microrganismos e de bolores e leveduras e para pesquisa de bactérias coliformes, existem as placas Compact Dry. Estas podem também ser uma boa alternativa para a contagem de *E. coli* e pesquisa de *Salmonella*, uma vez que a Imperial realiza estas análises através de laboratórios externos. Assim, as placas Compact Dry são um método de teste pronto, uma vez que o meio nutritivo necessário para o crescimento microbiano já se encontra preparado numa placa de Petri. Este método pode ser utilizado tanto para testar matérias-primas e produtos acabados, como para monitorização de superfícies, especialmente em áreas de difícil acesso (Ambifood, 2021a).

Desta forma, começa-se por selecionar a placa adequada à análise que se pretende realizar e logo de seguida, coloca-se 1 mL da amostra que se pretende analisar na placa e espera-se que todo o líquido se espalhe sozinho por toda a placa, tal como se pode observar na Figura 24.

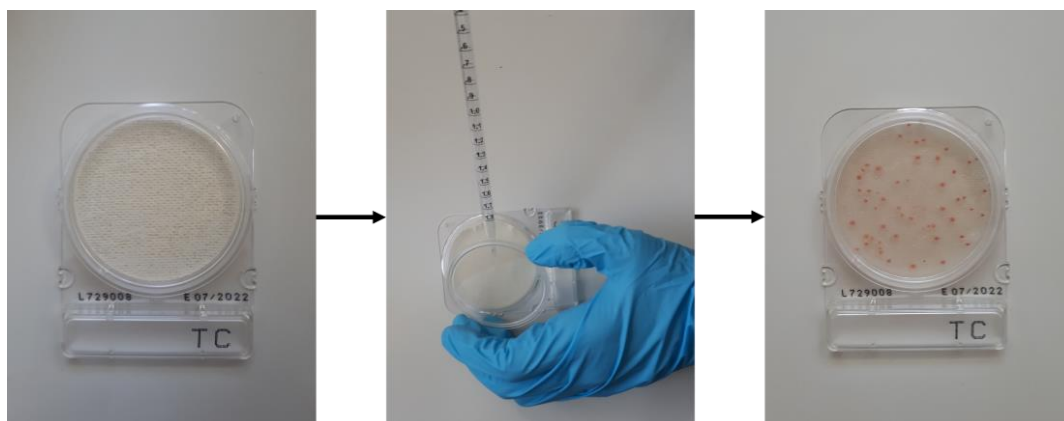


Figura 24 - Etapas do procedimento de utilização de uma placa Compact.

Por fim, coloca-se a placa fechada numa estufa para incubação, cujas condições dependem do tipo de análise que se está a realizar. Após o tempo de incubação, basta contar o número de colónias obtidas na placa e calcular o respetivo resultado, no caso da análise de contagem total de microrganismos e de bolores e leveduras. No caso da pesquisa de bactérias coliformes basta verificar se ocorreu crescimento destas colónias, que se distinguem das demais na placa através de uma coloração azul e no caso da pesquisa de *Salmonella*, as colónias apresentam uma coloração verde ou preta, dependendo do tipo de *Salmonella* presente.

3.2.2. Alternativas propostas: determinação do teor de gordura

3.2.2.1. Equipamento de Soxhlet automático

Uma das poucas alternativas de determinação de gordura encontrada no mercado é o equipamento de Soxhlet automático, que funciona de forma totalmente automática e que pode ser operado sem supervisão. De facto, este dispositivo pode estar ligado a um computador com um software específico que permite um controlo remoto de todo o processo de extração (Ambifood, 2021b).

Em relação ao procedimento associado a este método, começa-se igualmente com a preparação da amostra que se pretende analisar, tal como no método tradicional, dependendo se a amostra são grãos de cacau, se é um pó, se é fundível ou se é dura. Em segundo lugar, pesa-se 3 a 5 g da amostra (m) diretamente para um filtro de pregas e também se pesa um copo de extração que acompanha o equipamento (p_1), previamente seco na estufa a $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e arrefecido em exsiccador, numa balança com precisão de $\pm 0,0001$ g.

De seguida, o filtro de pregas é introduzido num cartucho de extração que por sua vez é colocado no copo de extração. O copo de extração é inserido no dispositivo de extração e inicia-se a extração com o

ligar do aquecimento e da água de arrefecimento. Na Figura 25 é possível encontrar as etapas automáticas que o equipamento realiza, não sendo necessário qualquer tipo de mão-de-obra.

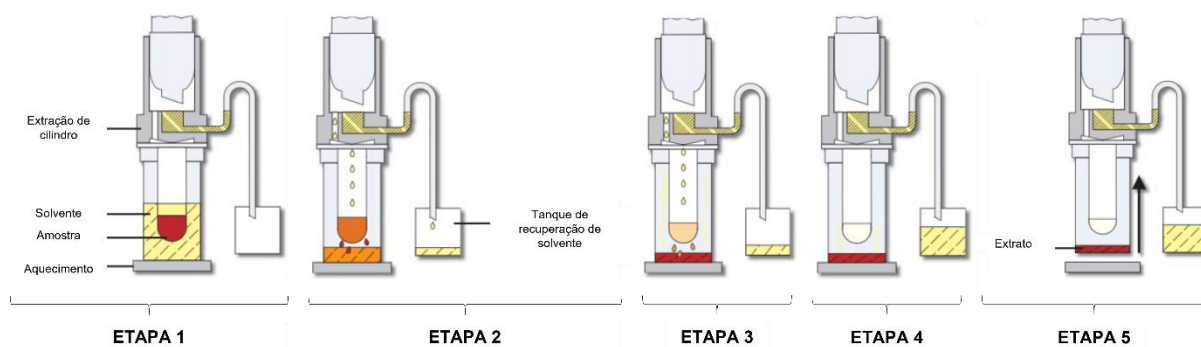


Figura 25 - Etapas do processo de extração com o equipamento de Soxhlet automático (Adaptado de Gerhardt, 2021).

Automaticamente, a amostra começa por ser imersa em solvente fervente (Etapa 1). O nível de solvente é reduzido abaixo do cartucho de extração, por evaporação, havendo uma recuperação do solvente num tanque de armazenamento (Etapa 2). Assim, a gordura é extraída pelo solvente condensado e é recolhida na parte de baixo do copo de extração (Etapa 3). O solvente, por sua vez, sofre uma destilação no tanque de armazenamento para que seja reaproveitado (Etapa 4). Por último, os copos de extração são levantados automaticamente da placa de aquecimento (Etapa 5) e desliga-se a água de arrefecimento e o aquecimento.

No fim, tal como no método tradicional atual, começa-se por remover e descartar o cartucho de extração e colocar o copo de extração na estufa a $(102 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por períodos sucessivos de 1 h, arrefecendo 30 min em exsicador e depois é pesado, até à obtenção de um peso igual ou superior ao imediatamente anterior. Por fim, o teor de gordura total do produto, expresso em percentagem com uma aproximação às décimas, é calculado através da Equação (2) apresentada anteriormente.

3.2.2.2. Determinação do teor de ácidos gordos livres

Como a manteiga de cacau é a gordura proveniente dos grãos de cacau, é importante testar o seu teor de ácidos gordos livres, geralmente medido pela quantidade de ácido oleico. Este parâmetro deve ser analisado, porque o nível de ácidos gordos livres presentes na manteiga de cacau altera a qualidade desta matéria-prima. De facto, níveis elevados de ácidos gordos ocorrem nos grãos de cacau que são armazenados incorretamente por um longo tempo, ou seja, num local muito quente e com alta humidade, ou como resultado da atividade microbológica. Em particular, a enzima lipase que existe naturalmente nos grãos de cacau e que atua na quebra do triglicerídeo, separando os seus grupos de ácidos gordos e

glicerol, “libertando” assim os ácidos gordos. Consequentemente, um elevado teor destes ácidos gordos confere um sabor rançoso ao chocolate (Dand, 2011b).

Atualmente a Imperial apenas analisa o teor de gordura da pasta de cacau, mas uma vez que a manteiga de cacau também é uma matéria-prima que afeta a qualidade do chocolate, propõem-se a determinação do teor de ácidos gordos livres de cada lote recebido. A norma ISO 660:2020 (International Organization for Standardization, 2020) apresenta a determinação da acidez ou do teor de ácidos gordos livres, através de três possíveis métodos: o método de solvente frio usando um indicador (método de referência); o método de solvente frio usando uma titulação potenciométrica (método de referência); e o método de etanol quente usando um indicador. Destas três opções, optou-se por escolher o método de solvente frio usando um indicador por se tratar de um método de referência e por ser o mais conhecido e estudado. Assim, começa-se por pesar a porção de testes correspondente ao tipo de óleo da amostra que se pretende analisar, de acordo com a Tabela 4, num frasco cónico de 250 mL. No caso da manteiga de cacau, esta é considerada um óleo vegetal refinado.

Tabela 4 - Massas da porção de teste e concentrações alcalinas (NaOH ou KOH) (International Organization for Standardization, 2020)

Grupo de produtos (exemplos)	Valor ácido aproximado	Porção de teste (g)	Concentração de NaOH ou KOH (mol/L)	Precisão da porção de teste (g)
Óleos vegetais refinados e gorduras animais	0 a 1	20	0,1	0,05
Óleos vegetais crus Gorduras animais de qualidade técnica	1 a 4	10	0,1	0,02
	4 a 15	2,5	0,1	0,01
Ácidos gordos de stock de sabão	15 a 75	0,5	0,1	0,001
		3,0	0,5	
Ácidos gordos técnicos	> 75	0,2	0,1	0,001
		1,0	0,5	

De seguida, prepara-se uma mistura de solventes, numa proporção de 1:1, utilizando-se etanol 96 % e éter dietílico, sem peróxido. Adiciona-se 50 a 100 mL desta mistura de solventes ao frasco cónico preparado inicialmente e dissolve-se a amostra que se pretende analisar, se necessário, com aquecimento suave. Prepara-se um suporte universal com uma bureta, tal como se observa na Figura 26 e deposita-se, na bureta, o titulante que se pretende usar, por norma o hidróxido de sódio (NaOH) com uma concentração de 0,1 mol/L.



Figura 26 – Material necessário para realizar uma titulação.

Depois de adicionado o indicador, por norma uma solução de fenolftaleína, a 1% em etanol e com agitação constante, vai-se adicionando o titulante até que o ponto de equivalência seja atingido, sendo necessário registar a quantidade de solução padrão utilizada. O ponto de equivalência só é atingido com o aparecimento de coloração rosa, que deve persistir durante, pelo menos, 30 s.

Finalmente, o resultado obtido é expresso em percentagem e de acordo com o ácido gordo maioritariamente presente no tipo de gordura analisada, sendo calculado através da Equação (4).

$$AGL/\% = \frac{V \cdot c \cdot M}{1\,000 \cdot m_{pt}} \cdot 100 \quad (4)$$

onde V é o volume, em mL, da solução volumétrica padrão de hidróxido de sódio utilizada, c é a concentração, em mol/L, da solução volumétrica padrão de hidróxido de sódio utilizada, M é a massa molar, em g/mol, do ácido gordo escolhido através da Tabela 5 e m_{pt} é a massa, em g, da porção de teste.

Tabela 5 - Escolha do tipo de ácido gordo para a expressão de acidez (International Organization for Standardization, 2020)

Tipo de gordura	Expressa em	Massa molar (g/mol)
Óleo de côco, óleo de palmiste e outros óleos similares	Ácido láurico	200
Óleo de palma	Ácido palmítico	256
Óleos de certas <i>Cruciferae</i> ^a	Ácido erúico	338
Outros tipos de gordura	Ácido oleico	286

^a No caso do óleo de colza com teor máximo de ácido erúico de 5%, a acidez será expressa em ácido oleico.

Nota: Se o resultado for relatado simplesmente como "acidez" sem outra definição, isso é, por convenção, expresso como ácido oleico. Se a amostra contém ácidos minerais, estes são, por convenção, determinados como ácidos gordos.

3.2.3. Alternativa proposta: determinação do teor de humidade

3.2.3.1. Analisador de humidade automático

Tal como apresentado anteriormente, o método de determinação do teor de humidade envolve muitos processos manuais e por isso, uma das alternativas existente no mercado é o uso de uma balança inteligente com uma aplicação de pesagem diferencial integrada. Observe-se na Figura 27 um exemplo de analisador de humidade automático.



Figura 27 - Equipamento analisador de humidade automático (Mettler Toledo, 2021).

Basicamente, apenas é necessário colocar o prato próprio para a medição dentro do analisador e tarar. De seguida, prepara-se a amostra, esta é colocada no analisador de humidade e inicia-se a medição. Em pouco tempo, o equipamento irá automaticamente calcular e apresentar o resultado do teor de humidade após a secagem e pesagem contínua.

3.2.4. Alternativas propostas: análises químicas e nutricionais

3.2.4.1. Kits rápidos para deteção de micotoxinas

Como alternativa aos métodos normalmente utilizados para deteção de micotoxinas, existe no mercado um *kit* rápido baseado na tecnologia de anticorpos monoclonais, utilizado para detetar micotoxinas em produtos alimentares (R-Biopharm, 2021a). O procedimento inicia com a preparação da amostra que se pretende analisar. Assim, pesa-se 50 g da amostra e prepara-se uma solução diluente de 80 mL de metanol com 20 mL de água destilada. Mistura-se esta solução com a amostra durante 15 min e filtra-se a mistura sob vácuo usando um papel de filtro. De seguida e dependendo do nível de deteção que se pretende, dilui-se o filtrado obtido num tubo de 10 mL com a solução diluente preparada inicialmente, conforme a Tabela 6.

Tabela 6 - Diluições necessárias realizar, dependendo do nível de detecção pretendido (R-Biopharm, 2021a)

		Nível de detecção (ppb)							
		2	4	5	8	10	15	20	30
Quantidade de solução necessária (mL)	Solução problema	1	1	1	1	1	1	1	0,5
	Solução diluente (80 mL de metanol com 20 mL de água destilada)	0	1	1,5	3	4	6,5	9	7

De seguida, coloca-se 1 mL da solução anterior num outro tubo e agita-se. Esta solução é depois filtrada com uma seringa filtrante para um tubo de 5 mL. Posteriormente, é necessário depositar vários reagentes prontos para uso, que se distinguem pela cor da etiqueta. Assim, deposita-se 0,5 mL da solução existente no tubo de 5 mL na cavidade do cartão de teste, sendo necessário esperar até que toda a solução seja absorvida. Deposita-se 0,1 mL de um reagente conjugado (etiqueta vermelha), sendo também necessário aguardar a absorção. Deposita-se 0,1 mL de um tampão de lavagem (etiqueta verde) e aguarda-se mais uma vez a absorção desta solução. Por último, deposita-se 0,1 mL de substrato (etiqueta azul) e deixa-se que a cor desenvolva durante 5 min. Após este tempo, aplica-se 0,1 mL de solução stop (etiqueta amarela), aguarda-se novamente 5 min e lê-se os resultados.

Em relação à interpretação dos resultados, a amostra deve ser considerada negativa, quando ocorre um desenvolvimento de cor claramente visível em ambos os pontos relativos à amostra e ao controlo. Por outro lado, a amostra deve ser considerada positiva, quando o ponto da amostra não desenvolve uma cor detetável. Para além disso, caso o ponto de controlo não desenvolva qualquer tipo de cor, o resultado é considerado inválido, sendo necessário repetir o procedimento com um novo cartão-teste.

3.2.4.2. Kits rápidos para detecção de alergénios

Uma alternativa para os métodos mais comumente usados, os teste ELISA e PCR, são os *kits* rápidos para detecção de alergénios que podem ser aplicados em amostras de alimentos ou em superfícies. Estes testes são ensaios imunocromatográficos muito sensíveis que usam anticorpos altamente purificados criados contra o alergénio em causa (Romer Labs, 2021).

Em relação ao método para análises de produtos, começa-se por homogeneizar a amostra que se pretende analisar com um almofariz e pilão. Depois, pesa-se 0,2 g de amostra homogeneizada no tubo de extração, que é posteriormente cheio com tampão de extração e agitado vigorosamente durante 1 min. Em relação ao método para análise em superfícies, começa-se por encher um tubo de extração com tampão de extração, onde depois é mergulhada uma zaragatoa de maneira a molhar a sua extremidade de amostragem. De seguida, passa-se a zaragatoa numa área de 5:5 cm, usando

movimentos de um lado para outro, girando a ponta conforme se avança. Por fim, coloca-se a zaragatoa no tubo de extração, quebra-se cuidadosamente a parte da zaragatoa que não fica dentro do tubo, este é fechado e agitado vigorosamente durante 1 min. A partir desta etapa, em ambas as análises, o procedimento é igual e resume-se a 4 etapas apresentadas na Figura 28.

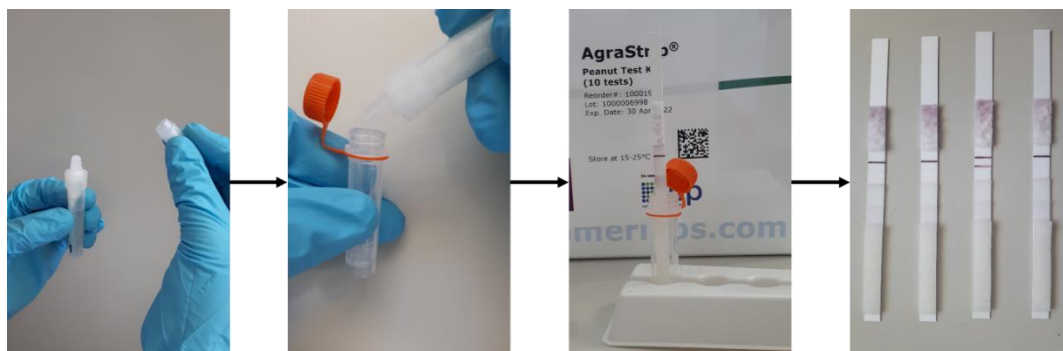


Figura 28 - Etapas do processo de determinação de alérgenos com os kits rápidos.

Remove-se a tampa do tubo de extração agitado e substitui-se por um conta-gotas, de forma a que seja possível transferir 12 gotas ou 400 μL para um frasco de incubação. Este frasco é também agitado vigorosamente durante 15 s, de maneira a que o líquido entre em contato com a tampa do frasco e é colocado num suporte, onde deve repousar durante 5 min. Depois, a tira de teste deve ser retirada do seu recipiente e colocada verticalmente no frasco de incubação, onde fica incubada durante 5 min.

Imediatamente após os 5 min de incubação, remove-se a tira de teste e lê-se o resultado. Caso o resultado seja negativo, apenas irá aparecer a linha de controle (C) na área de resultados. Caso o resultado seja positivo, aparecem duas linhas, a de controle (C) e a de teste (T), o que significa que a amostra contém o alérgeno alvo numa concentração superior ao LOD e, por isso, outras análises devem ser realizadas (como por exemplo o teste ELISA). Pode ainda existir um resultado inválido, em que nenhuma linha de controle aparece, sendo necessário repetir o procedimento com uma nova tira.

3.2.4.3. Dispositivo automático de determinação de açúcares

Dado que o método HPLC para deteção de açúcares é demorado e caro, uma solução alternativa é o uso de um pequeno dispositivo *walk-away* controlado a partir de um telemóvel com uma aplicação específica, que pode ser utilizado para detetar vários componentes alimentares de forma fácil e rápida nas instalações de produção ou pequenos laboratórios (R-Biopharm, 2021b). Para além deste dispositivo, é necessário um *kit* que contém um cartão/detector RFID (*Radio-frequency identification*), para identificação por radiofrequência e 32 testes enzimáticos. Na Figura 29 é possível observar as etapas do processo de determinação de açúcares, através deste dispositivo automático.

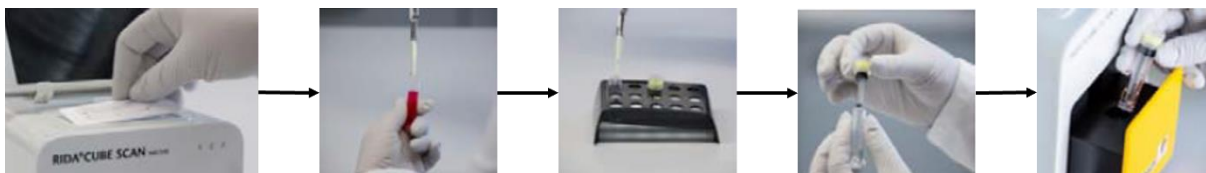


Figura 29 - Etapas do processo de determinação de açúcares, utilizando um dispositivo automático e um detetor RFID

(Adaptado de R-Biopharm, 2021b).

Em primeiro lugar, prepara-se a amostra que se pretende analisar, podendo ser necessário homogeneizar ou diluir a amostra. De seguida, coloca-se o cartão RFID no dispositivo e insere-se os dados referentes à amostra como a sua identificação e o volume que se irá colocar: 20 μL para uma aplicação básica ou 100 μL para uma aplicação sensível. Posteriormente, pipeta-se a amostra para o tubo de ensaio que possui o reagente 1 que depois é fechado com a tampa que possui o reagente 2. Por fim, insere-se este tubo no dispositivo e fecha-se a porta. Ao fim de algum tempo, a aplicação do telemóvel irá indicar os resultados obtidos, isto é, a quantidade em mg/L de açúcares, sem diferenciação.

Capítulo 4: Teste e viabilidade das alternativas propostas

Depois de conhecidas as alternativas propostas às análises de rotina, torna-se fundamental testar e perceber se estas são alternativas viáveis para o controlo de qualidade da Imperial. Assim, este capítulo divide-se em **Teste e viabilidade: análises microbiológicas**, **Teste e viabilidade: determinação do teor de gordura**, **Teste e viabilidade: determinação do teor de humidade** e, por último, **Teste e viabilidade: análises químicas e nutricionais**, onde são apresentados os resultados dos testes dos métodos alternativos que foi possível realizar e onde é feita uma comparação entre os métodos atuais e as alternativas propostas, para perceber qual a mais adequada.

4.1. Teste e viabilidade: análises microbiológicas

4.1.1. Teste e viabilidade da técnica de espalhamento da superfície

No caso da análise de contagem de bolores e leveduras, a norma ISO 21527:2008 que substituiu a norma ISO 7954:1987, passa a utilizar a técnica de espalhamento da superfície, por esta ser mais adequada do que a técnica de incorporação. A norma permite na mesma que se use a técnica de incorporação, mas neste caso a equivalência dos resultados deve ser validada em relação à inoculação na superfície, não sendo admitida a discriminação e diferenciação de bolores e leveduras. Assim, apesar da técnica de espalhamento da superfície poder fornecer enumerações mais altas, esta facilita a exposição máxima das células ao oxigénio atmosférico e evita qualquer risco de inativação térmica dos propágulos fúngicos (International Organization for Standardization, 2008).

Para além da alteração na técnica utilizada, é também necessário alterar o meio de cultura atualmente utilizado pela Imperial. Porém, o meio de cultura, DG18, do atual fornecedor não é comercializado pronto a usar, isto é, não basta apenas diluir o meio de cultura em pó, é necessário adicionar dois dos seus componentes: o cloranfenicol e o glicerol; o que faz aumentar o tempo de preparação deste meio de cultura. Assim, a Imperial aceitou que se testasse a técnica alternativa de espalhamento com o intuito de ser implementada, mas pediu que se realizasse um estudo para perceber se existe no mercado algum meio de cultura DG18 que se encontre pronto a usar.

Em primeiro lugar, foi realizado um estudo para perceber se existem alternativas ao meio de cultura DG18 apresentado pelo fornecedor atual da Imperial e, por isso, na Tabela 7 são apresentados os diferentes tipos de meios de cultura DG18 encontrados no mercado. De salientar que o custo associado apresentado se refere ao custo total necessário para preparar uma placa de Petri com este meio de cultura, para os diferentes fornecedores, e cujo cálculo se encontra no Anexo I.

Tabela 7 - Comparação dos vários meios de cultura DG18 disponíveis no mercado, em relação ao seu modo de preparação e aos seus custos associados

Fornecedor	Modo de preparação do meio de cultura	Custo (Ver Anexo I)
Fornecedor atual	1) Dissolver 15 g em 500 mL de água destilada, levando à ebulição com agitação frequente; 2) Adicionar 110 g de glicerol por 500 mL de meio de cultura; 3) Dissolver o conteúdo de um frasco de cloranfenicol com 3 mL de uma solução de etanol e água destilada (1:1) e adicioná-la ao meio; 4) Esterilizar no autoclave a 121 °C por 15 min, arrefecer até 45-50 °C, agitar bem e colocar em placas de Petri estéreis.	2,33 €/placa
Fornecedor alternativo 1	1) Dissolver 15,8 g em 500 mL de água destilada, aquecendo para dissolver completamente; 2) Adicionar 110g de glicerol por 500 mL de meio de cultura; 3) Aquecer suavemente a solução completa, para auxiliar na dissolução do glicerol; 4) Esterilizar no autoclave a 121 °C por 15 min, arrefecer até 50 °C, agitar bem e colocar em placas de Petri estéreis.	2,46 €/placa
Fornecedor alternativo 2	1) Deixar que os frascos de 100 mL atinjam a temperatura ambiente (se necessário); 2) Desapertar a tampa dos frascos e colocá-los em banho-maria para que atinjam aproximadamente os 50 °C; 3) Aumentar a temperatura para 100 °C e deixar o ágar derreter cerca de 20-30 min. 4) Apertar a tampa novamente, usando luvas de proteção e misturar; 5) Deixar os frascos à temperatura ambiente por pelo menos 15 s antes de transferi-los para um banho-maria para que atinjam os 44-47 °C; 6) Colocar em placas de Petri estéreis.	2,66 €/placa

Sabendo que o modo de preparação do meio de cultura atual utilizado pela Imperial demora cerca de 2 h, então, considerou-se que o modo de preparação do meio de cultura DG18 do fornecedor atual pode demorar cerca de 2 h 30 min, por possuir mais duas etapas, a adição de glicerol e cloranfenicol. Quanto ao meio de cultura DG18 do fornecedor alternativo 1, considerou-se que este pode demorar cerca de 2 h 15 min, porque aparenta ser um pouco mais rápido do que o anterior, uma vez que não é necessário adicionar o componente cloranfenicol. Relativamente ao meio de cultura DG18 do fornecedor alternativo 2, como o seu modo de preparação se resume ao seu derretimento, então considerou-se que este pode demorar apenas 1 h.

Apesar do tempo de preparação ser cada vez menor, o que consequentemente diminui os custos associados à mão-de-obra necessária, os custos associados aos consumíveis necessários para a

preparação dos meios de cultura é cada vez maior. Isto é, mesmo que o meio de cultura DG18 do fornecedor alternativo 2 seja o mais rápido de preparar, o facto de este ser comprado já pronto faz com que seja mais caro preparar uma única placa de Petri.

Resumindo, tendo em conta os custos associados e pressupondo que existe disponibilidade efetiva de mão-de-obra, o meio de cultura DG18 do fornecedor atual é o mais vantajoso. Porém, se existirem dificuldades de disponibilidade da mão-de-obra, ainda que em pequenos períodos, deve-se considerar a hipótese de utilização dos outros dois meios de cultura alternativos. Com base nestes pressupostos e depois de apresentado este estudo, a Imperial ficou de decidir qual a alternativa que pretende implementar.

Em segundo lugar, testou-se a técnica alternativa de espalhamento, comparando-a em simultâneo com a técnica de incorporação, em relação aos resultados obtidos. Assim, numa das análises semanais programadas foram selecionados quatro produtos diferentes e realizou-se, para cada um deles, a técnica de espalhamento e a técnica de incorporação, no que diz respeito à contagem de bolores e leveduras. Na Tabela 8 é possível encontrar os resultados obtidos que permitem comparar estas duas técnicas e no Anexo II encontra-se o respetivo suporte fotográfico.

Tabela 8 - Comparação dos resultados obtidos utilizando a técnica de incorporação e a técnica de espalhamento, em relação ao método de contagem de bolores e leveduras

Produto acabado analisado	Contagem de bolores e leveduras (g⁻¹)	
	Técnica de incorporação	Técnica de espalhamento
Produto A	0	1
Produto B	0	0
Produto C	38	45
Produto D	0	0

Antes demais, é importante referir que, para ambas as técnicas, o tempo de execução foi idêntico, o que facilita a possível implementação da técnica de espalhamento. No entanto, foi necessário comprar alguns espalhadores estéreis descartáveis, que custam cerca de 0,09 € cada um. Quanto aos resultados obtidos na Tabela 8, verifica-se que nos produtos A e C, os resultados obtidos pela técnica de espalhamento são um pouco superiores aos resultados obtidos pela técnica de incorporação. No entanto, independentemente destes resultados, a técnica de espalhamento foi proposta à Imperial por ser a recomendada pela norma ISO 21527-2:2008 (International Organization for Standardization, 2008).

Assim, apesar do custo ter aumentado, a Imperial decidiu aceitar este método que utiliza a técnica de espalhamento, pelo facto de não ter existido alterações no tempo de execução.

4.1.2. Teste e viabilidade das placas Compact Dry

As placas Compact Dry, apresentadas como uma alternativa às análises microbiológicas, foram testadas no laboratório do controlo de qualidade da Imperial, para verificar se não existem muitas diferenças nos resultados obtidos e para avaliar a sua facilidade de utilização. Assim, as placas Compact Dry relativas à contagem total de microrganismos foram testadas, em comparação com as placas preparadas manualmente, para os mesmos quatro produtos selecionados. Na Tabela 9 encontram-se os resultados obtidos e no Anexo III encontra-se o respetivo suporte fotográfico.

Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos utilizando as placas preparadas manualmente e as placas Compact Dry, em relação ao método de contagem total de microrganismos

Produto acabado analisado	Contagem total de microrganismos (g ⁻¹)			
	Placas preparadas manualmente		Placas Compact Dry	
	1ª diluição	2ª diluição	1ª diluição	2ª diluição
Produto A	1	0	1	0
Produto B	11	0	10	0
Produto C	62	14	65	16
Produto D	2	1	5	1

Em relação aos resultados obtidos pela técnica de incorporação, verifica-se que estes são muito semelhantes aos resultados obtidos pelas placas Compact Dry, não havendo diferenças significativas. No entanto, este não é o único critério que permite comparar os dois métodos e, por isso, na Tabela 10 é possível observar as diferenças existentes entre o método atual e as placas Compact Dry.

Tabela 10 - Comparação entre o método atual e o método alternativo para contagem total de microrganismos, contagem de bolores e leveduras e pesquisa de bactérias coliformes

Método Critérios	<u>Método atual:</u> Preparação manual das placas de Petri com meio de cultura	<u>Método alternativo:</u> Utilização das placas Compact Dry (Ambifood, 2021a)
Tempo de preparação	≈ 2 h	Prontas a usar
Dimensão da placa de Petri	Grandes dimensões	Pequenas dimensões
Condições de armazenamento	3 meses a 5 °C	24 meses à temperatura ambiente
Leitura dos resultados	Fácil contagem	Fácil contagem, mas com melhor distinção das colónias
Custos associados	≈ 0,37 €/placa (Ver Anexo IV)	≈ 1,25 €/placa

Uma das principais diferenças notadas durante o uso das placas Compact Dry, é o facto de estas placas serem mais pequenas, o que faz com que sejam mais fáceis de armazenar e incubar, pois não ocupam tanto espaço. Outro fator importante é o facto de o tempo de armazenamento destas placas ser muito superior ao das placas preparadas manualmente, pois o meio encontra-se desidratado. Por outro lado, as colónias que crescem nas placas Compact Dry apresentam uma cor vermelha, distinguindo-as perfeitamente do meio de cultura, o que não acontece com as placas preparadas manualmente.

Apesar de todas estas vantagens, a mais importante é o facto destas placas já se encontrarem prontas a usar, não sendo necessário 2 h de mão-de-obra para a sua preparação. Contudo, cada placa Compact Dry custa cerca de 1,25 €, enquanto a preparação manual das placas de Petri com meio de cultura custa cerca de 0,37 €, cujo cálculo se encontra detalhado no Anexo IV.

Assim, tendo em conta os custos associados e pressupondo que existe disponibilidade efetiva de mão-de-obra, as placas Compact Dry não são uma boa alternativa, porque são 3,38 vezes mais caras do que o método atual. Com base nestes pressupostos, a Imperial decidiu não implementar esta alternativa, mas deve-se considerar a sua utilização caso existam dificuldades de disponibilidade da mão-de-obra, ainda que em pequenos períodos.

Como teste complementar, decidiu-se avaliar a utilização destas placas alternativas para a contagem de *E. coli* e pesquisa de *Salmonella*, para perceber se esta seria mais vantajosa do que o envio de amostras para laboratório externo. Na Tabela 11, é possível encontrar as diferenças entre o método atual de envio de amostras para laboratório externo e o método alternativo de utilização das placas Compact Dry e respetivas normas, em relação ao tempo de preparação e obtenção dos resultados e os custos associados a cada um dos métodos.

Tabela 11 - Comparação entre o método atual e o método alternativo para contagem de *E. coli* e pesquisa de *Salmonella*

Método Critérios	<u>Método atual:</u> Envio de amostras para laboratório externo	<u>Método alternativo:</u> Utilização das placas Compact Dry (Ambifood, 2021a) e respetivas normas
Tempo de preparação	≈ 5 dias	≈ 1h 30 min
Tempo de obtenção dos resultados		≈ 21 h (contagem de <i>E. coli</i>) ≈ 24 h (pesquisa de <i>Salmonella</i>)
Custos associados	≈ 5 €/amostra (4 €/amostra para a contagem de <i>E. coli</i> e 6 €/amostra para a pesquisa de <i>Salmonella</i>)	≈ 4,49 €/amostra (contagem de <i>E. coli</i> e pesquisa de <i>Salmonella</i>) (ver Anexo V)

No que diz respeito ao tempo de preparação e de obtenção de resultados, constata-se que a alternativa proposta é um procedimento muito mais rápido do que o envio dos resultados por parte dos laboratórios externos. No entanto, o critério mais importante é o custo associado a esta alternativa proposta, cuja análise se encontra detalhada no Anexo V. Não tendo havido distinção entre o método de contagem de *E. coli* e a pesquisa de *Salmonella*, então verifica-se que o método alternativo proposto é 0,51 € mais barato do que o método atual de envio de amostras para laboratório externo.

Assim, o método alternativo proposto de utilização das Placas Compact Dry e respetivas normas é mais vantajoso do que o método atual, não tanto pelo custo associado, mas sim por causa do tempo de obtenção de resultados mais rápido. Porém, a Imperial não pretende voltar a realizar estas análises internamente, devido ao risco de contaminação, não tendo sido possível realizar a sua implementação.

4.2. Teste e viabilidade: determinação do teor de gordura

4.2.1. Viabilidade do equipamento de Soxhlet automático

O equipamento de Soxhlet automático apresenta o melhor desempenho de todos os sistemas de extração de laboratório disponíveis no mercado. É rápido, muito versátil, pode ser atualizado facilmente a qualquer momento e fornece os melhores resultados de análise de forma confiável e consistente (Ambifood, 2021b). Infelizmente, não foi possível testar este equipamento, mas realizou-se um estudo para comparar o tempo de preparação e obtenção dos resultados e os custos associados a cada um dos métodos de determinação da gordura, tal como se pode observar na Tabela 12.

Tabela 12 - Comparação entre o método atual e o método alternativo de determinação do teor de gordura

Método Critérios	<u>Método atual:</u> Soxhlet tradicional	<u>Método alternativo:</u> equipamento de Soxhlet automático (Ambifood, 2021b)
Tempo de preparação	≈ 30 min	≈ 10 min
Tempo de obtenção dos resultados	≈ 40 h	≈ 8 h
Custos associados	≈ 81 € por análise (ver Anexo VI)	≈ 1 000 € de investimento inicial + 44 € por análise (Anexo VI)

Note-se que o método alternativo apresentado é muitíssimo vantajoso, no que diz respeito ao tempo de preparação e de obtenção de resultados, mas principalmente no que se refere aos custos associados à respetiva análise. Em primeiro lugar, o tempo de preparação gasto com o equipamento alternativo proposto é muito menor do que o tempo gasto com o equipamento tradicional, para além de este ser mais rápido a realizar a extração de uma amostra, devido ao seu automatismo.

Em segundo lugar, é importante ter em conta o custo associado a cada um dos métodos, o que inclui os custos dos consumíveis e de mão-de-obra necessários, e cuja análise detalhada se encontra disponível no Anexo VI. Assim, o custo de uma análise com o equipamento alternativo proposto é cerca de 2 vezes inferior ao custo da análise utilizando o equipamento tradicional. No entanto, o investimento inicial associado a esta alternativa é muito elevado, apesar deste ser compensado a longo prazo pelo curto tempo de preparação, baixos custos associados e rapidez na obtenção dos resultados. Para além disso, acredita-se que esta alternativa apresente custos menores de manutenção, uma vez que a probabilidade de partir algum dos materiais de vidro necessários é quase nula, ao contrário do método tradicional.

Desta forma, tendo em conta todos os critérios apresentados, o método que utiliza o equipamento de Soxhlet automático é muito mais vantajoso. Contudo, a Imperial ainda se encontra a decidir se pretende ou não implementar este equipamento de Soxhlet automático.

4.2.2. Teste e viabilidade do método de determinação do teor de ácidos gordos livres

Após apresentação de um novo método de determinação de gordura, mais especificamente para a determinação do teor ácidos gordos livres na manteiga de cacau, este foi testado no laboratório do controlo de qualidade da Imperial que já possuía todos os materiais necessários. Caso não possuísse os materiais necessários, o custo mínimo associado a este investimento seria de 150 €, tal como foi calculado detalhadamente no Anexo VII. Na Tabela 13 encontram-se os resultados obtidos para três lotes de manteiga de cacau, testados em triplicado, tendo em conta que se usou, em cada teste, 50 mL da mistura de solventes e 6 gotas de fenolftaleína (cerca de 200 µL).

Tabela 13 - Resultados obtidos nos testes realizados para determinação de ácidos gordos livres

Manteiga de cacau		Massa da amostra (g)	Volume de hidróxido de sódio (mL)	Teor de ácidos gordos livres (%)	
Lote 1	Amostra A1	20,0172	9,50	1,36	1,30
	Amostra B1	20,0102	9,10	1,30	
	Amostra C1	19,9879	8,60	1,23	
Lote 2	Amostra A2	20,0000	9,40	1,34	1,30
	Amostra B2	20,0389	9,10	1,30	
	Amostra C2	20,0156	8,90	1,27	
Lote 3	Amostra A3	20,0148	9,60	1,37	1,35
	Amostra B3	20,0102	9,20	1,31	
	Amostra C3	20,0217	9,50	1,36	

Com estes testes realizados, foi possível saber quanto tempo é necessário para executar este método de determinação de ácidos gordos livres e qual o volume de hidróxido de sódio gasto, em média, para que posteriormente seja possível realizar uma avaliação dos custos associados a este método. Assim, o tempo máximo gasto com um único ensaio foi de 45 min, sendo que mais de metade deste tempo foi gasto na preparação da solução de hidróxido de sódio 0,1 M, cujo volume será aproximadamente de 0,1 L. Tendo em conta estes gastos e considerando o custo da mão-de-obra necessária, então cada análise de determinação realizada por este método custa cerca de 4 €, tal como foi calculado detalhadamente no Anexo VII.

Em relação aos resultados obtidos, verificou-se que os três lotes testados apresentam um teor de ácidos gordos livres de 1,30 % ou 1,35 %, o que se encontra dentro do esperado, uma vez que segundo a Diretiva 2000/36/CE, a manteiga de cacau obtida a partir dos grãos de cacau não pode apresentar um teor de ácidos gordos livres (expresso em ácido oleico) acima de 1,75 %.

Para além disso, estes resultados obtidos foram comparados com os valores apresentados no certificado de análises dado pelos respetivos fornecedores, referentes aos lotes estudados. Verificou-se que o teor de ácidos gordos livres apresentados pelo fornecedor é de cerca de 1,60 %, o que se traduz numa diferença de 0,30 %. Esta diferença deve ser analisada com mais testes, sendo, por isso, um fator importante para a decisão de implementação deste método nas análises de rotina da Imperial, como forma de validação dos resultados apresentados pelo fornecedor.

Assim, este foi aceite e implementado na Imperial, devido à sua facilidade de execução e baixo custo, mas principalmente devido à sua importância. No entanto, esta será efetuada apenas quando se achar necessário, porque à priori, os fornecedores realizam esta análise.

4.3. Teste e viabilidade: determinação do teor de humidade

4.3.1. Viabilidade do analisador de humidade automático

A alternativa apresentada para o método de determinação do teor de humidade, o analisador automático, reduz significativamente o risco de erros, possivelmente gerados por manuseio e cálculos incorretos. Além de fornecer um alto desempenho de pesagem, estes analisadores de humidade automáticos simplificam o procedimento de análise de determinação de humidade.

Apesar de não ter sido possível testar este analisador de humidade, a Tabela 14 reúne toda a informação recolhida e que compara este método com o atual, em relação ao tempo de execução, manuseio, utilização de múltiplas amostras ao mesmo tempo, precisão ou probabilidade de erro, a forma como é realizado o cálculo dos resultados e os respetivos custos associados.

Tabela 14 - Comparação entre o método atual e método alternativo de determinação do teor de humidade

Método Crítérios	<u>Método atual</u> : Secagem por estufa	<u>Método alternativo</u> : Analisador de humidade automático (Mettler Toledo, 2021)
Tempo de execução	4 h a 8 h	3 min a 15 min
Manuseio	Muitas etapas / Pesagem diferencial	Uma etapa / Medição direta
Possibilidade de testar múltiplas amostras ao mesmo tempo	Sim	Não
Precisão / Probabilidade de erro	Maior probabilidade de erro	Alta precisão
Cálculo dos resultados	Manual	Automática
Custos associados	≈ 6 € por análise (ver Anexo VIII)	≈ 2 500 € de investimento inicial + 1,14 € por análise (ver Anexo VIII)

Observando a Tabela 14, é possível constatar que existem muitas vantagens associadas ao método alternativo que utiliza o analisador de humidade automático. Em primeiro lugar, este apresenta um tempo de execução muito menor do que o método atual de secagem por estufa, sendo apenas necessário uma etapa de medição. Em segundo lugar, este método apresenta uma alta precisão de medição, não havendo tanta probabilidade de erro como no método atual. Mais ainda, o cálculo dos resultados é realizado automaticamente pelo equipamento, não sendo necessário mão-de-obra para o fazer.

Quanto às desvantagens apresentadas por este método, verifica-se que não há a possibilidade de testar mais do que uma amostra ao mesmo tempo e que este não é considerado um método de referência, sendo necessário validar a equivalência dos resultados. Contudo, o facto de não ser possível testar mais do que uma amostra ao mesmo tempo é compensado no reduzido tempo de obtenção de resultados e, apesar de este não ser um método de referência, acredita-se que o fornecedor do equipamento tenha realizado testes de equivalência dos resultados, o que viabiliza a sua implementação.

Por fim, em relação à avaliação de custos realizada e que se encontra em detalhe no Anexo VIII, verifica-se que o custo por análise do analisador de humidade automático é 5,26 vezes inferior ao método atual de secagem por estufa. Por outro lado, o custo de investimento inicial associado a este equipamento automático é muito elevado, mas este acaba por ser compensado a longo prazo pelo menor custo por análise, menor tempo de execução e pela maior precisão de resultados que apresenta.

Assim, este método alternativo é muitíssimo vantajoso, mas, até ao momento, não foi possível, implementá-lo na Imperial, devido ao seu custo de investimento inicial. Porém, foi realizada uma proposta interna acompanhada por vários orçamentos, para que mais tarde, caso haja oportunidade, se possa investir neste analisador de humidade automático.

4.4. Teste e viabilidade: análises químicas e nutricionais

4.4.1. Viabilidade dos *kits* rápidos para deteção de micotoxinas

As aflatoxinas são das micotoxinas mais perigosas para o ser humano, o que torna a sua determinação muitíssimo importante. Contudo, não tendo sido possível testar os *kits* rápidos para detetar a presença de aflatoxinas em algumas amostras de chocolate, como alternativa ao envio de amostras para laboratório externo, realizou-se um estudo que compara estes dois métodos.

Tendo em conta as etapas necessárias, estima-se que o tempo de preparação seja significativamente maior do que o apresentado pelo fornecedor dos *kits* rápidos de deteção da presença de aflatoxinas. Porém, apenas testando é que se saberá o seu tempo efetivo de preparação. Através da Tabela 15 é possível comparar o método atual de envio de amostras com o método alternativo de utilização de um *kit* rápido, no que diz respeito ao tempo de preparação e obtenção dos resultados e os custos associados.

Tabela 15 - Comparação entre o método atual e o método alternativo para deteção de micotoxinas

Método Crítérios	<u>Método atual:</u> Envio de amostras para laboratório externo	<u>Método alternativo:</u> Utilização de <i>kits</i> rápidos (R-Biopharm, 2021a)
Tempo de preparação	≈ 5 dias	20 min
Tempo de obtenção dos resultados		10 min
Custos associados	≈ 65 €/amostra	≈ 20 €/ <i>kit</i> (amostra)

Constata-se que este *kit* rápido de deteção de aflatoxinas totais é muito mais vantajoso em relação ao tempo de preparação e obtenção dos resultados e, principalmente, em relação aos custos associados. Assim, esta proposta alternativa foi apresentada e a Imperial encontra-se internamente a decidir se pretende implementá-la.

4.4.2. Teste e viabilidade dos *kits* rápidos para deteção de alergénios

Tendo sido dada a possibilidade de testar estes *kits* rápidos de deteção de alergénios, optou-se por determinar a presença do amendoim, por ser um dos alergénios mais críticos. A principal vantagem destes *kits* é o facto de poder ser utilizado em superfícies, uma vez que se se quisesse analisar o estado das superfícies dos equipamentos através de laboratórios externos, estes teriam de se deslocar à Imperial para realizar a amostragem, o que seria muito dispendioso.

Verificou-se, experimentalmente, que os *kits* são muito fáceis de usar, não sendo necessária especialização técnica e que o teste é muito rápido a apresentar resultados, sendo preciso esperar apenas 10 min. No caso da análise a amostras de chocolate, este método é um pouco mais demorado,

mas ainda assim é muito mais rápido do que enviar amostras para laboratório externo. Assim, na Tabela 16 é feita uma comparação entre o método atual de envio de amostras para laboratório externo e esta alternativa.

Tabela 16 - Comparação entre o método atual e o método alternativo para detecção de alergénios

Método Critérios	<u>Método atual:</u> Envio de amostras para laboratório externo	<u>Método alternativo:</u> Utilização de kits rápidos (Romer Labs, 2021)
Tipo de amostra	Produto acabado	Produto acabado e superfícies
Tempo de preparação	≈ 5 dias	5 min
Tempo de obtenção dos resultados		10 min
Custos associados	≈ 55 €/amostra	≈ 17 €/kit (amostra)

É possível constatar que, quer em tempo de obtenção de resultados, quer em custos associados, este kit de detecção de resíduos de alergénios (ex. amendoim) é muito vantajoso. No entanto, quer o kit seja usado em superfícies, quer seja usado para testar amostras de chocolate, é necessário ter em atenção que caso algum dos testes dê positivo, é necessário confirmar este resultado com o método ELISA ou PCR. Assim, esta proposta alternativa foi muito bem aceite por parte da Imperial, tendo sido assim possível implementar o uso destes kits rápidos para detetar vários tipos de alergénios, particularmente em superfícies de equipamentos. Consequentemente, também foi realizada uma instrução de trabalho.

4.4.3. Viabilidade do dispositivo automático de determinação de açúcares

Em relação ao dispositivo automático de determinação de açúcares, em alternativa ao envio de amostras para laboratório externo que utilizam o método HPLC, não foi possível testá-lo devido aos custos associados. Na Tabela 17 observam-se as diferenças entre o método de envio de amostras para laboratório externo e a utilização do dispositivo automático, em relação ao tempo de preparação, de obtenção de resultados e aos custos associados.

Tabela 17 - Comparação entre o método atual e o método alternativo para determinação de açúcares

Método Critérios	<u>Método atual:</u> Envio de amostras para laboratório externo	<u>Método alternativo:</u> Utilização do dispositivo automático (R-Biopharm, 2021b)
Tempo de preparação	≈ 5 dias	10 min
Tempo de obtenção dos resultados		10 min
Custos associados	≈ 20 €/amostra	≈ 3600 € investimento inicial (dispositivo) + 15 €/kit (amostra)

Verifica-se que o tempo de preparação e obtenção de resultados é uma das principais vantagens deste dispositivo, sendo também fácil de usar. Em relação aos custos associados, constata-se que esta alternativa apresenta um menor custo por análise, mas que possui um elevado custo de investimento inicial, que é compensado a longo prazo pelo menor custo de análise e pela rapidez na apresentação dos resultados obtidos. Assim, devido ao custo de investimento inicial necessário, a Imperial não conseguiu até ao momento implementar esta alternativa, mas é possível que no futuro o faça.

Capítulo 5. Considerações finais e recomendações futuras

Esta dissertação teve como principal objetivo a pesquisa de técnicas alternativas às análises de rotina do controlo de qualidade da Imperial, de forma a implementar técnicas mais rápidas e, se possível, mais baratas. Relativamente às análises microbiológicas, mais concretamente ao estudo realizado para saber qual o melhor meio de cultura DG18 existente no mercado, é possível concluir que apesar do meio de cultura do fornecedor atual ser o mais demorado, no que diz respeito ao tempo de preparação, este apresenta um custo total associado menor. No entanto, ficou nas mãos da Imperial decidir qual dos meios implementar.

Por outro lado, é possível concluir que apesar do tempo demorado associado à preparação das placas com meio de cultura, este método é muito mais barato do que comprar as placas Compact Dry prontas a usar. Como estudo complementar, verificou-se que para contagem de *E. coli* ou pesquisa de *Salmonella*, as placas prontas a usar são mais vantajosas, pois o seu custo associado é um pouco menor do que enviar amostra para laboratório externo, mas principalmente devido ao tempo de obtenção dos resultados. Porém, a Imperial optou por não voltar a realizar estas análises internamente.

No que diz respeito às análises físico-químicas, é possível concluir que, quer para a determinação de humidade, quer para a determinação de gordura, a utilização dos respetivos equipamentos automáticos alternativos é muito mais vantajosa do que a utilização dos métodos atuais. Porém, os custos associados ao investimento inicial não permitiram a implementação destas alternativas. Quanto ao método de determinação do teor de ácidos gordos livres, depois de testado, foi possível concluir que este não é um método caro e demorado e que este é importante para testar a qualidade da manteiga e, principalmente para verificar e validar os resultados enviados pelo fornecedor.

Quanto às análises químicas e nutricionais, a utilização dos *kits* rápidos demonstrou-se muito vantajosa, quer em relação ao tempo de obtenção de resultados e custos associados. No caso da determinação de micotoxinas, a Imperial ficou de decidir internamente se implementava ou não esta alternativa. Relativamente à deteção de alergénios, o *kit* rápido tem ainda a vantagem de poder ser usado para testar superfícies de equipamentos, motivo que levou a Imperial a aceitar e implementar esta alternativa. Porém, para determinação de açúcares, o *kit* rápido está associado a um dispositivo automático, que apresenta um custo de investimento inicial muito elevado, não tendo sido por possível implementar esta alternativa na Imperial até ao momento.

Apesar da utilização destes *kits* rápidos ser muito vantajosa, é importante referir que estes apresentam limitações quanto ao níveis de deteção, sendo por isso necessário validar os resultados obtidos com a realização de análises externas. Estes acabam por ser muito vantajosos quando se

pretende obter resultados rápidos, fundamentais para que seja possível controlar rapidamente a ocorrência de perigos químicos e nutricionais.

Finalmente, recomenda-se que, em contínuo ou no futuro, se faça uma pesquisa de novas alternativas, porque estão sempre a aparecer novos métodos de análise, cuja rapidez e facilidade é maior. Para além disso, recomenda-se uma monitorização periódica dos custos associados às soluções que foram aceites e implementadas na Imperial, para perceber se, em termos monetários, estas continuam a ser as mais vantajosas. Por último e caso seja possível, recomenda-se uma futura avaliação dos equipamentos alternativos apresentados que não foram testados nesta dissertação de mestrado. De facto, estes testes são de grande importância, pois é com estes que realmente se comprova que as alternativas apresentadas são mais vantajosas.

Referências bibliográficas

- Afoakwa, E. O. (2010). *Chocolate Science and Technology*.
- Ambifood. (2021a). Detecção no ambiente de produção - Compact Dry. Obtido 15 de Agosto de 2021, de <https://www.ambifood.com/pt/catalogo/alimentar/testes-microbiologia/detecao-no-ambiente-de-producao/>
- Ambifood. (2021b). Gordura - Soxtherm. Obtido 15 de Agosto de 2021, de <https://www.ambifood.com/pt/catalogo/alimentar/quimica-de-alimentos/gordura/>
- ASAE. (2017). HACCP - O que é. Obtido 15 de Agosto de 2021, de <https://www.asae.gov.pt/perguntas-frequentes1/haccp-o-que-e.aspx>
- Beckett, S. T. (2008). The History of Chocolate. Em *The Science of Chocolate: Edition 2* (pp. 1–10). <https://doi.org/10.1039/9781847558053-00001>
- Beckett, S. T. (2009). *Industrial Chocolate Manufacture and Use (Fourth Edition)*.
- Caligiani, A., Marseglia, A., & Palla, G. (2016). Cocoa: Production, Chemistry, and Use. Em *Encyclopedia of Food and Health*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00177-X>
- Castro, F. (2020). Imperial responde à pandemia com aumento de 30% da produção de tabletes de chocolate. Obtido 15 de Março de 2021, de Sapo.pt website: <https://eco.sapo.pt/reportagem/imperial-responde-a-pandemia-com-aumento-de-30-da-producao-de-tabletes-de-chocolate/>
- CBI - Ministry of Foreign Affairs. (2020). What is the demand for cocoa on the European market? Obtido 15 de Março de 2021, de <https://www.cbi.eu/market-information/cocoa/trade-statistics>
- Certif. (2021). Certificação HACCP. Obtido 15 de Março de 2021, de <http://www.certif.pt/haccp.asp>
- Cidell, J. L., & Alberts, H. C. (2006). Constructing quality : The multinational histories of chocolate. *Geoforum*, 37(6), 999–1007. <https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2006.02.006>
- Cocoa & Chocolate online. (2021). 5.1.4 Grinding methods. Obtido 15 de Agosto de 2021, de <https://www.cacaochocolade.nl/main.php?lng=1&p=inhoud&h=5&g=1&s=4&z=0&sp=>
- Cook, L. R. (1982). *Chocolate Production and Use*.
- Cook, L. R. (2021). Cocoa. Obtido 15 de Março de 2021, de Britannica website: <https://www.britannica.com/topic/cocoa-food>
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Lemes, D. P., Nakano, F., & Taniwaki, M. H. (2012). Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control*, 26(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.023>
- Dand, R. (2011a). 1 - History and origins of the international cocoa trade. Em *The International Cocoa*

- Trade (Third Edition)* (pp. 1–22). <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-125-3.50001-X>
- Dand, R. (2011b). 9 - Cocoa bean processing and the manufacture of chocolate. Em *The International Cocoa Trade (Third Edition)* (pp. 268–289). <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-125-3.50009-4>
- Directindustry. (2021). Máquina de moldagem de chocolate. Obtido 15 de Março de 2021, de <https://www.directindustry.com/pt/prod/amp-rose/product-94421-1954115.html>
- ExportersIndia.com. (2021). RF-02 Roll Chocolate Refiner Machine. Obtido 15 de Março de 2021, de <https://www.exportersindia.com/bblfoodspvtltd-3712610/rf-02-roll-chocolate-refiner-machine-2022796.htm>
- Frangioni, Z. (2016). Nibs de cacau é chocolate 100% cacau antes de virar tablete. Obtido 15 de Março de 2021, de Chocólatras online website: <https://chocolatrasonline.com.br/nibs-de-cacau-e-chocolate-100-cacau-antes-de-virar-tablete/>
- Gerhardt. (2021). User manual - Soxtherm. Obtido 15 de Agosto de 2021, de <https://www.gerhardt.de/de/produktlinien/fest-fluessig-extraktion/extraktionseinheiten-soxthermr/>
- Giacometti, J., Jolić, S. M., & Josić, D. (2015). Chapter 73 - Cocoa Processing and Impact on Composition. Em *Processing and Impact on Active Components in Food* (pp. 605–612). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00073-1>
- Gika, H., Kaklamanos, G., Manesiotis, P., & Theodoridis, G. (2015). Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography. Em *Encyclopedia of Food and Health*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00159-8>
- HHUB. (2021). Método ELISA. Obtido 15 de Agosto de 2021, de <https://www.hhub.com.br/noticias/metodo-elisa>
- Hoy, M. A. (2013). DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. Em *Insect Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415874-0.00008-1>
- Imagens de Marca. (2011). História de Marca. Obtido 15 de Março de 2021, de Sapo.pt website: <http://imagensdemarca.sapo.pt/atualidade/historias-de-marca-43/>
- Imperial. (2021). Descubra os nossos chocolates. Obtido 15 de Março de 2021, de <https://www.imperial.pt/>
- Indiamart. (2021). Choco Man Refiner Conche 40, Capacity: 40kg. Obtido 15 de Março de 2021, de <https://www.indiamart.com/proddetail/choco-man-refiner-conche-40-10742781433.html>
- Instituto Português da Qualidade. (1981). *NP-1719 Cacau e produtos seus derivados — Determinação*

da gordura.

Instituto Português da Qualidade. (1983). *NP-2164 Microbiologia alimentar — Regras gerais para pesquisa de bactérias coliformes.*

International Organization for Standardization. (1987). *ISO 7954:1987 Microbiology — General guidance for enumeration of yeasts and moulds — Colony count technique at 25 degrees C.*

International Organization for Standardization. (1991). *ISO 4833:1991 Microbiology — General guidance for the enumeration of micro-organisms — Colony count technique at 30 degrees C.*

International Organization for Standardization. (2008). *ISO 21527-2:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95.*

International Organization for Standardization. (2020). *ISO 660:2020 Animal and vegetable fats and oils — Determination of acid value and acidity.*

Jornal Renovação. (2020). Fábrica de Chocolates Imperial de Vila do Conde com quebra de mais de 50% nas vendas da Páscoa. Obtido 15 de Março de 2021, de <http://jornal-renovacao.pt/2020/04/fabrica-chocolates-imperial-vila-do-conde-quebra-50-nas-vendas-da-pascoa/>

Machine Sale. (2020). Cocoa Butter Press 12 Pots. Obtido 15 de Agosto de 2021, de http://machinesale.nl/2_Cocoa_Processing_Machinery.htm

Mettler Toledo. (2021). HE53 modelo 230V. Obtido 15 de Agosto de 2021, de https://www.mt.com/br/pt/home/products/Laboratory_Weighing_Solutions/moisture-analyzer/entry_moistureanalyzer/HE53_230V.html

Minifie, B. W. (2012). *Chocolate, Cocoa and Confectionery: Science and Technology (Third Edition)* (Third Edit). <https://doi.org/10.1002/food.19810250618>

Parlamento Europeu, & Conselho da União Europeia. (2000). Diretiva 2000/36/CE de 23 de Junho de 2000 relativa aos produtos de cacau e de chocolate destinados à alimentação humana. *Jornal Oficial da União Europeia.*

Parlamento Europeu, & Conselho da União Europeia. (2004). Regulamento (CE) N° 852/2004 de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia.*

Parlamento Europeu, & Conselho da União Europeia. (2011). Regulamento (UE) N° 1169/2011 de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia.*

Potrowl, P. (2019). Camille Bloch chocolate museum in Courtelary. Obtido 15 de Agosto de 2021, de

- Wikimedia Commons website: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Courtelary_-_Machine_à_enrober_le_chocolat_au_musée_de_la_chocolaterie_Camille_Bloch_-_2.jpg
- R-Biopharm. (2021a). Aflacard total. Obtido 15 de Agosto de 2021, de <https://food.r-biopharm.com/products/aflacard-total/>
- R-Biopharm. (2021b). RIDA®CUBE Sucrose / D-Glucose / D-Fructose. Obtido 15 de Agosto de 2021, de <https://food.r-biopharm.com/products/ridacube-sucrose-d-glucose-d-fructose/>
- Romer Labs. (2021). Kits de análises rápidos e confiáveis para detecção de alérgenos alimentares. Obtido 15 de Agosto de 2021, de <https://www.romerlabs.com/pt/produtos/kits-de-analises/alergenicos-alimentares/>
- Sharma, G. M., Khuda, S. E., Parker, C. H., Eischeid, A. C., & Pereira, M. (2016). Detection of allergen markers in food: Analytical methods. *Food Safety: Innovative Analytical Tools for Safety Assessment*, 65–121. <https://doi.org/10.1002/9781119160588.ch4>
- Talbot, G. (2009). *Science and Technology of Enrobed and Filled Chocolate, Confectionery and Bakery Products*. <https://doi.org/10.1533/9781845696436>
- Verna, R. (2013). The history and science of chocolate. *Malaysian Journal of Pathology*, 35(2), 111–121.

Anexos

Anexo I – Custos associados aos diferentes meios de cultura DG18 existentes no mercado

Dependendo do fornecedor, o modo de preparação do meio de cultura DG18 é diferente e consequentemente, o custo associado também será diferente. No caso do fornecedor atual, é necessário dissolver o meio de cultura em água destilada, adicionar glicerol e uma solução de cloranfenicol diluído em etanol e água destilada. No caso do fornecedor alternativo 1, basta apenas dissolver o meio de cultura em água destilada e adicionar glicerol e, por último, no caso do fornecedor alternativo 2, o meio de cultura já se encontra pronto a utilizar, sendo necessário derretê-lo duas vezes em banho-maria e depois colocá-lo em placas de Petri..

I.1. Custos associados ao meio de cultura DG18 do fornecedor atual

Primeiramente, é necessário calcular os custos associados aos consumíveis necessários para a preparação deste meio de cultura. Sabe-se que para diluir 15 g do meio de cultura DG18 é necessário 0,5 L de água destilada. Como 500 g de meio de cultura custam 45 €, então 15 g custam 1,35 € e se 0,5 L de água destilada custam 1,5 €, então o custo da diluição do meio de cultura em água destilada é de cerca de 2,85 €/0,5 L.

De seguida, aos 15 g de meio de cultura diluído é preciso adicionar 1 vial de cloranfenicol também diluído. Para diluir 1 vial (0,05 g) de cloranfenicol, que custa 4 €, é necessário preparar uma solução de 3 mL de etanol com água destilada (1:1), isto é, em 3 mL da solução, metade será etanol e a outra metade será água destilada. O custo do etanol é de 20 €/L, então o custo da solução de diluição (Cd) é dado pela Equação (5).

$$Cd = 0,0015 \text{ L} \times \left(\frac{1,5 \text{ €} + 10 \text{ €}}{0,5 \text{ L}} \right) = 0,03 \text{ €/0,5 L} \quad (5)$$

Desta forma, o custo de preparação do cloranfenicol diluído é de cerca de 4,03 €/0,5 L. Por último, apenas é necessário adicionar 110 mL de glicerol, que custam cerca de 44 €. Assim, por 0,5 L, o custo total associado aos consumíveis deste modo de preparação é de cerca de 50,88 €, o que corresponde a cerca de 102 €/L. Considerando que cada placa de Petri leva 0,02 L de meio de cultura diluído, então para 1 L de meio de cultura diluído é possível preparar 50 placas de Petri com meio de cultura, o que faz com que o custo do meio de cultura diluído por placa seja 2,04 €.

Relativamente ao custo da mão-de-obra, considera-se que apenas é necessária 1 pessoa que recebe um salário mensal de 700 € e que num mês trabalha cerca de 160 h (considerando que num mês

existem 4 semanas e que por semana se trabalham 40 h), então o custo da mão-de-obra é de aproximadamente 4,38 €/h. Considerando que para preparar as 50 placas se demora 2 h 30 min, então o custo da mão-de-obra para preparar 50 placas é de aproximadamente 11 €, o que corresponde a 0,22 €/placa.

Assim, o custo total associado à preparação do meio de cultura DG18 do fornecedor atual corresponde à soma do custo do meio de cultura apresentado (2,04 €), do custo de uma placa de Petri (0,07 €) e do custo de mão-de-obra para preparar uma placa (0,22 €), o que equivale a 2,33 €/placa.

I.2. Custos associados ao meio de cultura DG18 do fornecedor alternativo 1

Em relação ao fornecedor alternativo 1, começa-se por diluir 15,8 g de meio de cultura DG18 que já possui o cloranfenicol em 0,5 L de água destilada. Como 500 g custam 290 €, então os 15,8 g de meio de cultura necessários custam 9,16 €, o que faz com que o custo da diluição do meio de cultura em água destilada seja de cerca de 10,66 €/0,5 L, uma vez que 0,5 L de água destilada também custam 1,5 €. Em segundo lugar, basta apenas adicionar 110 mL, que também custam cerca de 44 €, fazendo com que o custo associado a este modo de preparação seja de cerca de 54,66 €/0,5L, o que corresponde a total de cerca de 109 €/L. Considerando que cada placa de Petri leva 0,02 L de meio de cultura diluído, então para 1 L de meio de cultura diluído é possível preparar 50 placas de Petri com meio de cultura, o que faz com que o custo do meio de cultura diluído seja de 2,19 €/placa.

Relativamente ao custo da mão-de-obra, considera-se, novamente, que apenas é necessária 1 pessoa que recebe um salário mensal de 700 € e que num mês trabalha cerca de 160 h (considerando que num mês existem 4 semanas e que por semana se trabalham 40 h), então o custo da mão-de-obra é de aproximadamente 4,38 €/h. Considerando que para preparar as 50 placas se demora 2 h 15 min, então o custo da mão-de-obra para preparar 50 placas é de 9,84 €, o que corresponde a 0,20 €/placa.

Assim, o custo total associado à preparação do meio de cultura DG18 do fornecedor atual corresponde à soma do custo do meio de cultura apresentado (2,19 €), do custo de uma placa de Petri (0,07 €) e do custo de mão-de-obra para preparar uma placa (0,20 €), o que equivale a 2,46 €/placa.

I.3. Custos associados ao meio de cultura DG18 do fornecedor alternativo 2

Por fim, o fornecedor alternativo 2 já possui o meio de cultura DG18 pronto a ser usado, cujo custo é de 75 €/0,6 L, o que corresponde a cerca de 125 €/L. Considerando que cada placa de Petri leva 0,02 L de meio de cultura diluído, então para 1 L de meio de cultura diluído é possível preparar 50 placas de Petri com meio de cultura, o que faz com que o custo do meio de cultura diluído seja de 2,50 €/placa.

Relativamente ao custo da mão-de-obra, considera-se, mais uma vez, que apenas é necessária 1 pessoa que recebe um salário mensal de 700 € e que num mês trabalha cerca de 160 h (considerando que num mês existem 4 semanas e que por semana se trabalham 40 h), então o custo da mão-de-obra é de aproximadamente 4,38 €/h. Considerando que para preparar as 50 placas se demora 1 h, então o custo da mão-de-obra para preparar 50 placas é de 2,19 €, o que corresponde a 0,04 €/placa.

Assim, o custo total associado à preparação do meio de cultura DG18 do fornecedor atual corresponde à soma do custo do meio de cultura apresentado (2,50 €), do custo de uma placa de Petri (0,07 €) e do custo de mão-de-obra para preparar uma placa (0,09 €), o que equivale a 2,66 €/placa.

Anexo II – Suporte fotográfico: comparação entre a técnica de incorporação e a técnica de espalhamento para contagem de bolores e leveduras

Relativamente aos testes realizados que comparam a técnica de incorporação com a técnica de espalhamento, é possível observar na Figura os resultados obtidos.

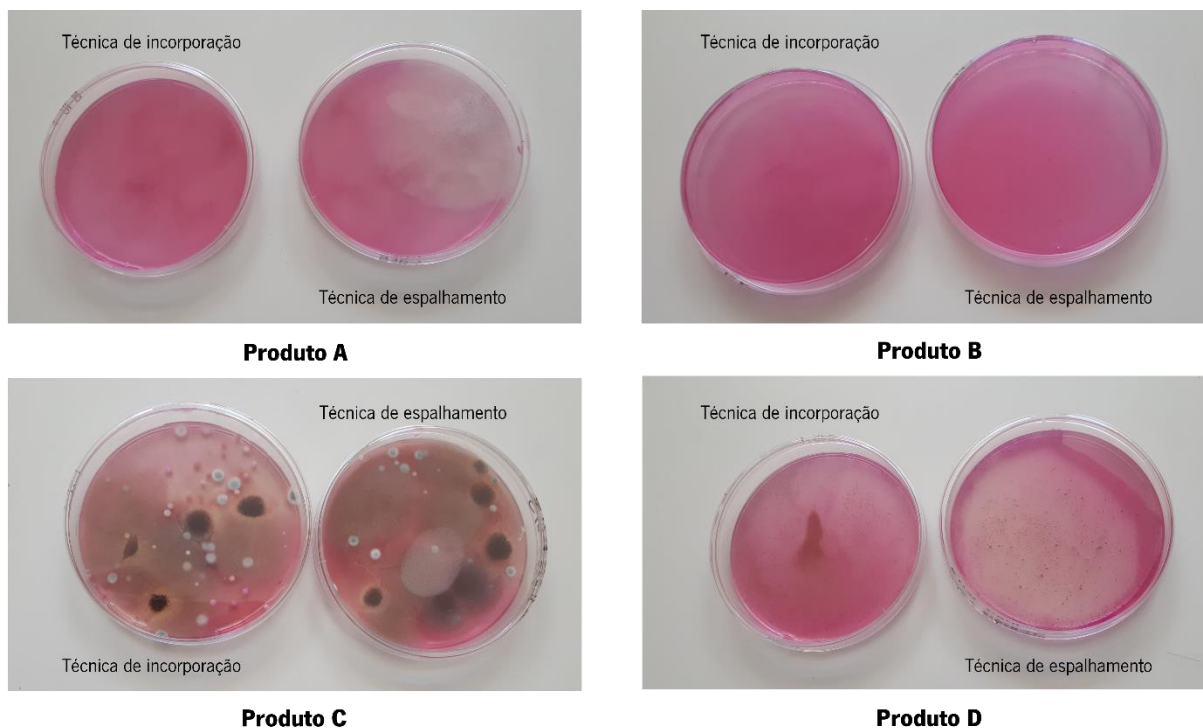
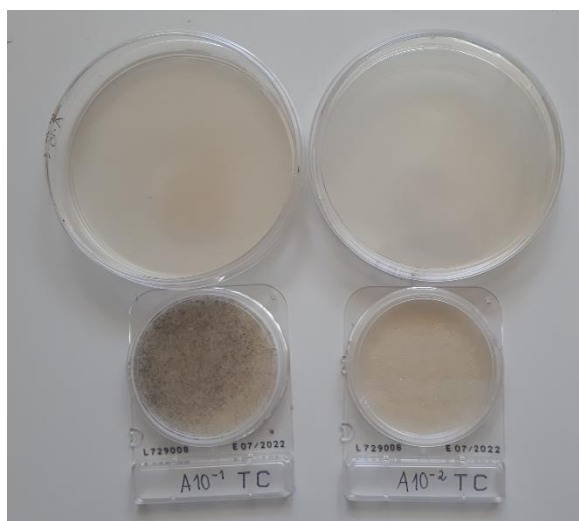


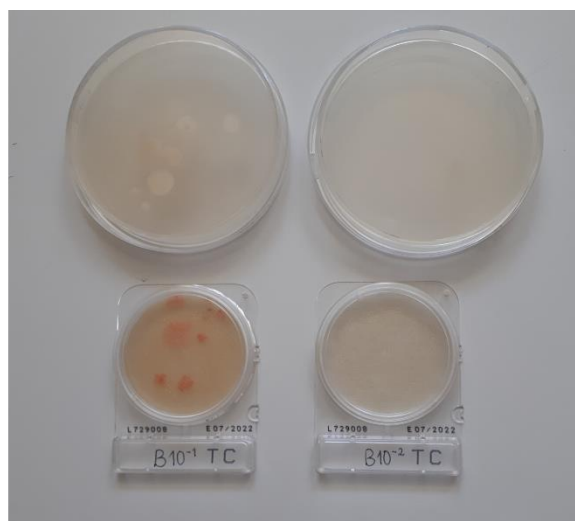
Figura I.1 - Suporte fotográfico relativo aos resultados obtidos no teste que compara a técnica de incorporação e espalhamento, relativo à contagem de bolores e leveduras.

Anexo III – Suporte fotográfico: comparação entre a técnica de incorporação e as placas Compact Dry para contagem total de microrganismos

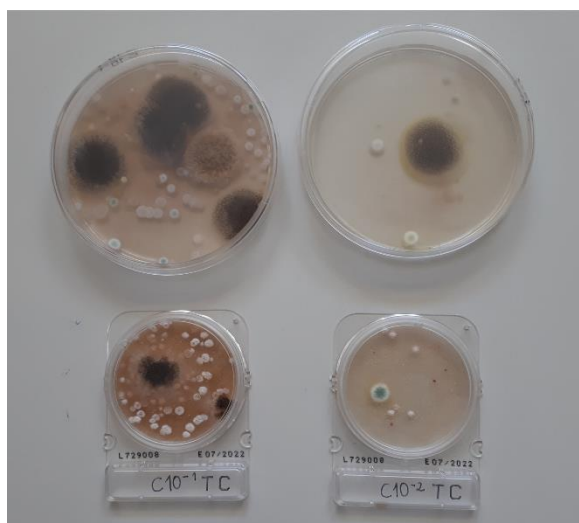
Relativamente ao testes realizados que comparam as placas preparadas manualmente e as placas Compact Dry, é possível observar na os resultados obtidos.



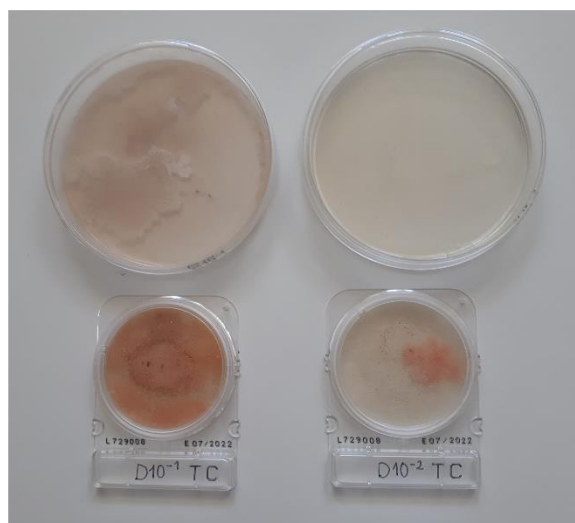
Produto A



Produto B



Produto C



Produto D

Figura II.1 - Suporte fotográfico relativo aos resultados obtidos no teste que compara as placas preparadas manualmente e as placas Compact Dry, relativo à contagem total de microrganismos.

Anexo IV – Custos associados à preparação manual das placas de Petri com meio de cultura

Considere-se que, para a preparação dos meios de cultura utilizados para realizar as análises microbiológicas, é necessário ter em conta o custo dos consumíveis (placa de Petri, meio de cultura em pó e água destilada), o custo do uso do autoclave também em consumíveis (água e energia) e o custo da mão-de-obra necessária. Assim, o custo total de 0,37 € corresponde à soma destes três parâmetros, que são agora explicados ao pormenor.

IV.1. Custos associados aos consumíveis

Os consumíveis são as placas de Petri descartáveis, os meios de cultura em pó e a água destilada. Assim, sabe-se que 720 placas de Petri custam cerca de 50 €, que a água destilada custa cerca de 3 €/L e que, dependendo do meio, 500 g custam cerca de 40 €. Para cada preparação, é necessário 25 g de meio de cultura em pó e 1 L de água destilada e, portanto, 25 g custam cerca de 2 €.

Considerando que cada placa de Petri leva 0,02 L de meio de cultura diluído, então para 1 L de meio de cultura diluído é possível preparar 50 placas de Petri com meio de cultura. Assim, na Equação (6) é apresentado o custo total de todos os consumíveis necessários por placa (C_{tc}).

$$C_{tc} = \frac{50 \text{ €}}{720} + \frac{2 \text{ €} + 3 \text{ €}}{50} = 0,17 \text{ €} \quad (6)$$

IV.2. Custos associados ao uso do autoclave

Os custos associados ao uso do autoclave são basicamente os custos associados à água e eletricidade gasta. O preço da água da companhia é de cerca de 0,0018 €/L e o preço da eletricidade é de cerca de 0,2 €/kWh. Todo o meio de cultura diluído terá de ser esterilizado, pelo que é necessário considerar sempre uma utilização do autoclave.

Sabendo que para uma utilização, o autoclave permanece ligado durante cerca de 1 h e considerando que este gasta 6,6 kWh durante esse tempo, então o custo da energia elétrica gasta por cada utilização é de cerca de 1,20 €/50 placas.

No que concerne à água necessária para o funcionamento do autoclave, sabe-se que o seu volume gasto corresponde ao volume de uma parte do autoclave. Esta parte tem a forma de um cilindro que possui 5 dm³ de diâmetro e 3 dm³ de altura. Assim, na Equação (7) encontra-se o cálculo do volume de água necessária para que o autoclave funcione (V_w).

$$V_w = \frac{\pi}{4} \cdot 5^2 \cdot 3 \text{ dm}^3 = 58,9 \text{ L} \quad (7)$$

Assim, o custo de 58,9 L de água necessária para o funcionamento do autoclave é de 0,11 €/50 placas.

Desta forma, o custo total associado ao uso do autoclave é de 1,31 €/50 placas, o que corresponde a cerca de 0,03 €/placa.

IV.3. Custos associados à mão-de-obra necessária

Para todo este procedimento de preparação dos meios de cultura em placas de Petri, é apenas necessária 1 pessoa. Considerando que esta pessoa recebe um salário mensal de 700 € e que num mês trabalha cerca de 160 h (considerando que num mês existem 4 semanas e que por semana se trabalham 40 h), então o custo da mão-de-obra é de aproximadamente 4,38 €/h.

Para a preparação de 50 placas de Petri com meio de cultura, a pessoa gasta cerca de 2 h de trabalho (1 h de controlo do autoclave e 1 h para o restante procedimento), então o custo de mão-de-obra para preparar 50 placas é de 8,75 €, o que corresponde a 0,18 €/placa.

Anexo V – Custos associados à utilização das placas Compact Dry e respetivas normas para a contagem de *E. coli* e pesquisa de *Salmonella*

Considere-se que, para a análise contagem de *E. coli* ou pesquisa de *Salmonella* utilizando as placas Compact Dry prontas a usar é necessário considerar os custos associados às próprias placas Compact Dry, aos restantes consumíveis para a preparação do meio de diluição (meio de diluição em pó e água destilada), ao uso do autoclave também em consumíveis e ainda é o custo da mão-de-obra implícita a todo este método. Assim, o custo total de 4,49 € corresponde à soma destes três parâmetros, que são agora explicados ao pormenor.

V.1. Custos associados aos consumíveis

Os consumíveis são a placa Compact Dry pronta a usar, o meio de diluição em pó e a água destilada. Assim, sabe-se que cada placa Compact Dry custa 1,5 €, que a água destilada custa cerca de 3 €/L e que 500 g de meio de diluição custam cerca de 25 €. Para cada preparação, é necessário 20 g de meio de cultura em pó e 1 L de água destilada e, portanto, 20 g custam 1 €.

Considerando que para diluir uma vez a amostra que se pretende analisar é necessário 0,09 L de meio de diluição, então o custo do meio de diluição por amostra (C_{md}) necessário para analisar uma amostra é dado pela Equação (8).

$$C_{md} = \frac{2 \text{ €} + 3 \text{ €}}{1 \text{ L}} \times 0,09 \text{ L} = 0,36 \text{ €} \quad (8)$$

Assim, o custo total de todos os consumíveis necessários é igual a 1,86 €, o que corresponde à soma do custo de uma placa Compact Dry pronta a usar (1,5 €) e o custo de 90 mL de meio de diluição líquido (0,36 €).

V.2. Custos associados ao uso do autoclave

Os custos associados ao uso do autoclave são basicamente os custos associados à água e eletricidade gasta. O preço da água da companhia é de cerca de 0,0018 €/L e o preço da eletricidade é de cerca de 0,2 €/kWh. Todo o meio de diluição líquido terá de ser esterilizado, pelo que é necessário considerar sempre uma utilização do autoclave. Todos estes cálculos são iguais ao cálculo na secção IV.2 do Anexo IV e, por isso, o custo associado ao uso do autoclave é de 1,31 € para a preparação de 1 L de meio de diluição líquido. Assim, como só é necessário 1 frasco com 0,09 L de meio de diluição líquido, então o custo associado à sua esterilização é de 0,12 €.

V.3. Custos associados à mão-de-obra necessária

Para todo este procedimento de análise de contagem de *E. coli* ou pesquisa de *Salmonella*, é apenas necessária 1 pessoa. Considerando que esta pessoa recebe um salário mensal de 700 € e que num mês trabalha cerca de 160 h (considerando que num mês existem 4 semanas e que por semana se trabalham 40 h), então o custo da mão-de-obra é de aproximadamente 4,38 €/h.

Para a preparação de 1 L de meio de diluição líquido, a pessoa gasta cerca de 1 h 30 min de trabalho (1 h de controlo do autoclave e 1 h para o restante procedimento) e, por isso, para preparar um frasco com 0,09 L são necessários cerca de 8 min. Para além disso, considerou-se o tempo necessário para realizar a diluição da amostra propriamente dita e para inocular as placas Compact Dry que já se encontram prontas a usar, sendo assim necessário 10 min de mão-de-obra. Assim, para estes 18 min, o custo da mão-de-obra necessária é de 1,32 €.

Anexo VI – Custos associados ao método de Soxhlet tradicional e ao equipamento de Soxhlet automático

De forma a comparar os custos associados ao método de Soxhlet tradicional e ao equipamento de Soxhlet automático, é necessário ter em conta o custo do investimento inicial, o custo dos consumíveis necessários para realizar este método e o custo da mão-de-obra implícita.

VI.1. Custos associados ao método de Soxhlet tradicional

Em relação ao método de Soxhlet tradicional, mais concretamente no que diz respeito aos consumíveis necessários, deve-se ter em conta os custos associados aos cartuchos de celulose, às perdas de éter de petróleo que acabam por ocorrer, à água de arrefecimento gasta e à energia consumida pelo equipamento. Considerando uma única extração, um cartucho de celulose custa cerca de 4 € e as perdas associadas ao éter de petróleo rondam os 0,05 L, o que corresponde a 0,60 €, pois 2,5 L deste reagente é de cerca 30 €. Por outro lado, considerando que uma extração demora 40 h e que o caudal da água de arrefecimento é de aproximadamente 3,75 L/min, o que equivale a 225 L/h, então gasta-se cerca de 9000 L de água, que custam 16,5 €, uma vez que o preço da água da rede é de 0,0018 €/L. Por fim, sabendo que a energia consumida pela manta de aquecimento do equipamento, em 40 h de extração é de cerca de 36 kWh e que o preço da energia é de 0,2 € por kWh, então o custo da energia elétrica, por uma extração é de cerca de 7,2 €.

Relativamente ao custo da mão-de-obra, considera-se que apenas é necessária 1 pessoa que recebe um salário mensal de 700 € e que num mês trabalha cerca de 160 h (considerando que num mês existem 4 semanas e que por semana se trabalham 40 h), então o custo da mão-de-obra é de aproximadamente 4,38 €/h. Considerando que nas 40 h de extração, essa pessoa apenas trabalha 12 h, então o custo da mão-de-obra por análise/extração é de cerca de 53 €.

Assim, para se realizar uma análise que demora 40 h de extração, o custo total associado à determinação do teor de gordura pelo método tradicional ($Ct1$) encontra-se calculado na Equação (9).

$$Ct1 = 4 + 0,60 + 16,5 + 7,2 + 53 = 81 \text{ €} \quad (9)$$

VI.2. Custos associados ao equipamento de Soxhlet automático

Primeiramente, sabe-se que, o custo do investimento inicial está relacionado com todos os elementos relacionados com o equipamento, o que corresponde a cerca de 1 000 €.

Quanto aos consumíveis necessários, tal como no método anterior, deve-se ter em conta os custos associados aos cartuchos de celulose, às perdas de éter de petróleo que acabam por ocorrer, à água de arrefecimento gasta e à energia consumida pelo equipamento. Considerando uma única extração, um cartucho de celulose custa cerca de 4 € e as perdas associadas ao éter de petróleo rondam os 0,01 L, o que corresponde a 0,12 €, pois 2,5 L deste reagente é de cerca 30 €. Este custo é mais baixo que o anterior, uma vez que as perdas ocorridas com este equipamento são muito menores. Por outro lado, considera-se que uma extração demora 10 h, pois este equipamento é muito mais rápido, e que o caudal da água de arrefecimento é de aproximadamente 3 L/min, pois este equipamento controla o caudal de água de maneira a que haja o menor gasto de água possível, o que equivale a 180 L/h. Assim, gasta-se cerca de 1 440 L de água, que custam 3,30 €, uma vez que o preço da água da rede é de 0,0018 €/L. Por fim, sabendo que a energia consumida pelo equipamento, em 10 h de extração é de cerca de 8 kWh e que o preço da energia é de 0,20 € por kWh, então o custo da energia elétrica, por uma extração é de cerca de 1,60 €.

Relativamente ao custo da mão-de-obra, considera-se que apenas é necessária 1 pessoa que recebe um salário mensal de 700 € e que num mês trabalha cerca de 160 h (considerando que num mês existem 4 semanas e que por semana se trabalham 40 h), então o custo da mão-de-obra é de aproximadamente 4,38 €/h. Considerando que nas 10 h de extração, essa pessoa apenas trabalha 8 h, então o custo da mão-de-obra por análise/extração é de cerca de 35 €.

Assim, para se realizar uma análise que demora 10 h de extração, o custo total associado ao método de determinação do teor de gordura pelo método automático (*Ct2*) encontra-se calculado na Equação (10).

$$Ct2 = 4 + 0,12 + 3,30 + 1,60 + 35 = 44 \text{ €} \quad (10)$$

Anexo VII – Custos associados ao método de determinação do teor de ácidos gordos livres

Para saber os custos inerentes ao método de determinação do teor de ácidos gordos livres, é fundamental primeiro saber o custo do investimento inicial, se necessário, e de seguida, o custo por determinação de uma amostra, considerando o custo dos consumíveis e o custo da mão-de-obra implícita.

Em relação ao custo do investimento inicial, considera-se apenas o custo de uma bureta de 25 mL, de um erlenmeyer de 250 mL e de um suporte universal. No entanto, também é necessário uma balança analítica para a medição de massa de amostra que se pretende pesar e de hidróxido de sódio que se pretende diluir. Desta forma, o custo da bureta de 25 mL ronda os 100 €, o custo de um erlenmeyer de 250 mL é de cerca de 10 € e um suporte universal custa cerca de 40 €, o que dá um total de 150 €.

No que diz respeito aos consumíveis necessários, deve-se ter em conta os custos associados ao hidróxido de sódio, à água destilada usada para diluir, o custo do indicador fenolftaleína e o custo do etanol e da éter dietílico. Considerando os ensaios realizados experimentalmente, sabe-se que, no máximo, são necessários 0,1 mL de solução de hidróxido de sódio com uma molaridade de 0,1. Assim, pela Equação (11) é possível calcular o número de moles de hidróxido de sódio necessário.

$$c = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 0,1 \text{ L} = 0,01 \text{ mol} \quad (11)$$

Sabendo o número de moles e sabendo que a massa molar é de 39,997 g/mol, então é possível saber a massa que é necessário pesar de hidróxido de sódio, através da Equação (12).

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,01 \text{ mol} \times 39,997 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,39997 \text{ g} \quad (12)$$

Uma vez que 1 kg de hidróxido de sódio custa aproximadamente 3 €, então 0,39997 g custam cerca de 0,0012 €. Em relação ao custo da água destilada, mais uma vez, esta custa 3,00 €/L, o que faz com que 0,1 L custem 0,3 €. No entanto, aconselha-se a preparar um maior volume para que não seja preciso estar sempre a preparar esta solução, sempre que se quiser realizar este método de determinação.

Quanto ao custo do indicador fenolftaleína, considera-se que se usam 6 gotas em cada análise realizada, o que equivale a cerca de 200 µL. Como 1 L de fenolftaleína custa cerca de 30 €, então 6 gotas custam aproximadamente 0,006 €. Quanto ao custo do etanol e éter dietílico, usa-se 25 mL de cada um, o etanol custa 20 €/L e o éter dietílico custa 10 €/L, o que faz com que o custo da solução mistura destes dois reagentes custe cerca de 0,75 €.

Finalmente, de forma a calcular o custo da mão-de-obra, considera-se que apenas é necessária 1 pessoa que recebe um salário mensal de 700 € e que num mês trabalha cerca de 160 h (considerando

que num mês existem 4 semanas e que por semana se trabalham 40 h), então o custo da mão-de-obra é de aproximadamente 4,38 €/h. Considerando que para realizar este método se gastou 30 min para a preparação de todo o material e apenas 15 min para a titulação propriamente dita, então o custo da mão-de-obra deste método de determinação do teor de ácidos gordos livres é aproximadamente 4 €.

Assim, para se realizar uma análise que demora 45 min, o custo total associado ao método de determinação do teor de ácidos gordos livres ($Ct3$) encontra-se calculado na Equação (13).

$$Ct3 = 0,0012 + 0,006 + 0,5 + 0,25 + 3,28 = 4,04 \text{ €} \quad (13)$$

Anexo VIII – Custos associados ao método de secagem por estufa e ao analisador de humidade automático

De forma a comparar os custos associados ao método de secagem por estufa e ao método de secagem utilizando o analisador de humidade automático, é importante ter em conta o custo do investimento inicial, o custo dos consumíveis necessários para realizar este método e também o custo da mão-de-obra implícita.

VIII.1. Custos associados ao método de secagem por estufa

Em primeiro lugar, é necessário calcular o custo dos consumíveis necessários, sendo apenas importante ter em conta o custo da energia consumida pelos equipamentos utilizados, nomeadamente a estufa de secagem e a balança analítica, durante cerca de 8 h, sendo este o tempo necessário para realizar seis análises. Assim, considerando que, em 8 h, a estufa de secagem consome 8 kWh e que a balança analítica consome 0,08 kWh, então o custo da energia elétrica (C_e) gasta pelos equipamentos é apresentado na Equação (14), sabendo que o custo da energia elétrica é de 0,2 €/kWh.

$$C_e = (8 \text{ kWh} + 0,08 \text{ kWh}) \times 0,2 \text{ €/kWh} = 1,62 \text{ €} \quad (14)$$

Em relação ao custo da mão-de-obra, considera-se que apenas é necessária 1 pessoa que recebe um salário mensal de 700 € e que num mês trabalha cerca de 160 h (considerando que num mês existem 4 semanas e que por semana se trabalham 40 h), então o custo da mão-de-obra é de aproximadamente 4,38 €/h. Considerando que o tempo de mão-de-obra necessária é igual ao tempo de realização de seis análises, então em 8 h, o custo da mão-de-obra é de cerca de 35 €/6 análises.

Assim, o custo associado à determinação de seis análises é de aproximadamente 37 €, o que corresponde à soma do custo de energia consumida pelos equipamentos e do custo da mão-de-obra necessária. Para saber o custo associado a uma única análise basta dividir por seis, resultando num custo associado de cerca de 6 €.

VIII.2. Custos associados ao analisador de humidade automático

Em primeiro lugar, o custo associado ao investimento inicial é de 2 500 €, o que inclui a balança de determinação da humidade e um prato onde se coloca a amostra que se pretende analisar.

Quanto aos consumíveis necessários, apenas é preciso ter em conta o custo da energia consumida pelo equipamento durante cerca de 15 min, sendo este o tempo necessário para realizar uma única análise. Assim, considerando que, em 15 min, o analisador de humidade automático consome 0,25 kWh

e que o custo da energia elétrica é de 0,2 €/kWh, então o valor total associado ao preço da energia elétrica gasta por análise é de 0,05 €.

Em relação ao custo da mão-de-obra, considera-se que apenas é necessária 1 pessoa que recebe um salário mensal de 700 € e que num mês trabalha cerca de 160 h (considerando que num mês existem 4 semanas e que por semana se trabalham 40 h), então o custo da mão-de-obra é de aproximadamente 4,38 €/h. Considerando que o tempo de mão-de-obra necessária é igual ao tempo de realização de uma análise, então em 15 min, o custo da mão-de-obra é de cerca de 1,09 €/análise.

Assim, o custo associado à determinação de uma análise é de aproximadamente 1,14 €, o que corresponde à soma do custo de energia consumida pelo analisador automático de humidade e do custo da mão-de-obra necessária.