

**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Ana Patrícia Correia Campos

**Avaliação da termorresistência  
de *Bacillus cereus* em preparados de cereais  
com base na variação da temperatura,  
pH e atividade da água**

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

Trabalho realizado sob orientação do  
**Professor Doutora Lígia Raquel Marona Rodrigues**  
e da  
**Doutora Cristina Martins Rodrigues**

## DECLARAÇÃO

Nome: Ana Patrícia Correia Campos

Título da dissertação: Avaliação da termorresistência de *Bacillus cereus* em preparados de cereais com base na variação da temperatura, pH e atividade da água

Orientadores:

Professor Doutora Lígia Raquel Marona Rodrigues

Doutora Cristina Martins Rodrigues

Ano de conclusão: 2018

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ramo Tecnologia Química e Alimentar

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Universidade do Minho, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura:

## Agradecimentos

Este segmento será dedicado a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o meu sucesso académico ao longo destes cinco anos, principalmente nos últimos meses durante o projeto que desenvolvi na Frulact.

Primeiramente, gostaria de agradecer a toda a equipa do Centro de Investigação e Desenvolvimento da Frulact, por todo o apoio prestado ao longo destes meses, nomeadamente à Engenheira Cândida Miranda por me ter dado a oportunidade de desenvolver o meu projeto junto da sua exemplar equipa.

À Doutora Cristina Rodrigues, minha orientadora na Frulact, pela paciência, partilha de conhecimento, simpatia e confiança no meu trabalho durante o desenvolvimento do projeto.

À Professora Doutora Lígia Rodrigues, minha orientadora na Universidade do Minho, pela sua orientação, simpatia, partilha de conhecimentos, prontidão e paciência sempre que a solicitei.

Agradecer também ao Paulico pela paciência e disponibilidade que teve para marcar marmitas ao longo destes meses. Não esquecendo, o departamento do desenvolvimento e o departamento de inovação, especialmente, toda a equipa que partilhou o laboratório comigo, à Inês, ao Lino, à Stéphanie, à Filipa, à Ana, à Isabel, à Helena, à Rita, ao João, ao Ricardo e ao Vítor, os quais estiveram sempre prontos a ajudar-me, apoiando em tudo aquilo que eu precisei a todos os níveis. Levo-vos no meu coração!

Às minhas companheiras de viagens, à Inês e à Dora, por todo encorajamento, pela boa disposição, pelos desabafos e pela amizade.

Aos meus pais por me terem dado a oportunidade de tirar um curso, e por todo o amor, carinho e encorajamento. À minha irmã por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Aos amigos que esta caminhada na vida académica me trouxe, nomeadamente a Carina e a Sara.

Ao Zé Miguel por ser a pessoa que nunca desiste de mim, por ser o primeiro a acreditar que vou cumprir os meus objetivos. Nunca irei ser suficientemente grata, por todo o amor, carinho, compreensão e apoio durante esta jornada por vezes difícil, mas que no fim, de certeza, irá valer a pena. Muito obrigada a todos!



## Resumo

A indústria alimentar tem cada vez uma maior preocupação com a qualidade e segurança alimentar dos seus produtos e nesse sentido, um maior cuidado também com a eliminação de possíveis contaminações. Assim, tem-se registado um esforço contínuo na pesquisa de novos organismos e no desenvolvimento de metodologias para os controlar e combater. Essas metodologias têm naturalmente em conta o controlo das condições ótimas de desenvolvimento dos microrganismos, nomeadamente temperatura, pH e atividade da água ( $A_w$ ), entre outras. O principal objetivo deste projeto passou por avaliar o impacto dos binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização na termorresistência de *Bacillus cereus* quando o mesmo foi inserido em quatro preparados de cereais em diferentes condições de pH e  $A_w$ . Para isso, determinaram-se os parâmetros cinéticos de morte térmica para cada um dos binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização ( $D_T$  e  $z$ ) nos diferentes preparados e avaliaram-se os efeitos do pH e da  $A_w$  nos mesmos. Para o Preparado 1 (pH=5.5 e  $A_w > 0.95$ ) obtiveram-se os seguintes valores:  $D_{80^\circ\text{C}}=11.6$  min;  $z= 58.5$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 30 °C/3 h e  $D_{80^\circ\text{C}}= 10.1$  min;  $z = 70.4$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 50 °C/3 h. No caso do Preparado 2 (pH=4 e  $A_w > 0.95$ ), obtiveram-se  $D_{80^\circ\text{C}}=10.2$  min;  $z =15.8$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 30 °C/3 h e  $D_{80^\circ\text{C}}= 2.3$  min, a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 50 °C/3 h (neste caso, não foi possível a determinação de  $z$ ). No caso do Preparado 3 (pH=5.5 e  $A_w \geq 0.90$ ) comparativamente ao Preparado 4 (pH=4 e  $A_w \geq 0.90$ ), este apresentou  $D_{80^\circ\text{C}}= 34.7$  min e  $z =20.2$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 30 °C/3 h, bem como  $D_{80^\circ\text{C}}= 6.5$  min e  $z = 13.3$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 50 °C/3 h. Relativamente, ao Preparado 4 obtiveram-se  $D_{80^\circ\text{C}}=94.3$  min e  $z = 15.7$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 30 °C/3 h, bem como  $D_{80^\circ\text{C}}= 10.6$  min e  $z = 10.7$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 50 °C/3 h. Desta forma foi possível constatar que em termos de valores associados a  $z$ , as condições do Preparado 4 seriam, à partida, as ideais à eliminação de *B. cereus*, apresentando valores mais baixos. No entanto, olhando para os valores de  $D_T$  e tendo em consideração os custos associados a cada uma das condições, conclui-se que as condições do Preparado 2, no binómio de temperatura/tempo de ingredientação 30 °C/3 h, são as mais eficazes.

**Palavras-chave:** ingredientação; pasteurização; termorresistência; acidez; disponibilidade da água



## Abstract

The food industry has a growing concern regarding food quality and safety of their products and therefore, a greater care towards the elimination of possible contaminations. Hence, a continuous effort has been registered in the research of new spoilage organisms and development of methodologies to control and combat them. Naturally, such methodologies take into account the optimum conditions for the development of microorganisms, namely temperature, pH and water activity ( $A_w$ ), among others. The main purpose of this project was to evaluate the impact of mixing and pasteurization temperature/time binomials on the *Bacillus cereus* thermoresistance when it is added to four different cereal preparations under different pH and  $A_w$  conditions. For that purpose, the kinetic parameters of thermal death ( $D$ - $e$   $z$ ) were determined for each mixing and pasteurization temperature/time binomial in the different cereal preparations and the effect of pH and  $A_w$  on them was also assessed. For the Preparation 1 (pH=5.5 and  $A_w > 0.95$ ) the following values were obtained:  $D_{80^\circ\text{C}} = 11.6$  min;  $z = 58.5$  °C for a mixing temperature/time binomial of 30 °C/3 h and  $D_{80^\circ\text{C}} = 10.1$  min;  $z = 70.4$  °C for a mixing temperature/time binomial of 50 °C/3 h. In the case of Preparation 2 (pH=4 and  $A_w > 0.95$ ), the following values were obtained:  $D_{80^\circ\text{C}} = 10.2$  min;  $z = 15.8$  °C for a mixing temperature/time binomial of 30 °C/3 h and  $D_{80^\circ\text{C}} = 2.3$  min, for a mixing temperature/time binomial of 50 °C/3 h (in this case it was not possible to determine the  $z$ -value). Comparing Preparation 3 (pH=5.5 and  $A_w \geq 0.90$ ) to Preparation 4 (pH=4 and  $A_w \geq 0.90$ ), it showed a  $D_{80^\circ\text{C}} = 34.7$  min and  $z = 20.2$  °C for a mixing temperature/time binomial of 30 °C/3 h, as well as  $D_{80^\circ\text{C}} = 6.5$  min e  $z = 13.3$  °C for a mixing temperature/time binomial of 50 °C/3 h. Regarding the Preparation 4,  $D_{80^\circ\text{C}} = 94.3$  min and  $z = 15.7$  °C were obtained for a mixing temperature/time binomial of 30 °C/3 h, as well as  $D_{80^\circ\text{C}} = 10.6$  min and  $z = 10.7$  °C for a mixing temperature/time binomial of 50 °C/3 h. Thus, it was possible to note that the conditions and  $z$ -values associated to Preparation 4 were, at first sight, the preferable ones for *B.cereus* elimination, once it has lower  $z$ -values. However, considering the  $D$ -values of all preparations and the related costs, it can be conclude that the conditions of Preparation 2, at a mixing temperature/time binomial of 30 °C/3 h, are those that best suit the company requirements at all levels.

**Keywords:** mixing; pasteurization; thermoresistance; acidity; water availability





## Lista de siglas e abreviaturas

<b>°Brix</b>	Grau Brix (grandeza que mede a quantidade de compostos solúveis)
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Aw</b>	Atividade da água
<b>BPW</b>	<i>Buffered Peptone Water</i>
<b>CE</b>	Comissão Europeia
<b>COTEC</b>	Associação Empresarial para a Inovação
<b>D<sub>T</sub>/D-value</b>	Tempo necessário para uma dada T destruir 90% da população
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i>
<b>HACCP</b>	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>
<b>ISO</b>	<i>International Standard Organization</i>
<b>MP</b>	Matéria-prima
<b>p</b>	Pressão de vapor de água em equilíbrio com o alimento
<b>p<sub>0</sub></b>	Pressão de vapor de água pura à mesma temperatura de p
<b>PE</b>	Protocolo Específico
<b>PCA</b>	<i>Plate Count Agar</i>
<b>PME</b>	Pequenas e Médias Empresas
<b>PwC</b>	<i>PricewaterCoopers</i>
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colónias
<b>z/z-value</b>	Intervalo de T necessário para alterar D <sub>T</sub> num ciclo logarítmico



## Índice

Capítulo 1 – Introdução .....	1
1.1 Motivação e enquadramento do projeto .....	1
1.2 Apresentação da empresa .....	4
1.3 Objetivos do projeto.....	5
1.4 Organização da dissertação .....	6
Capítulo 2 – Fundamentos teóricos do projeto .....	7
2.1 Conceito de microbiologia alimentar .....	7
2.2 Higiene e segurança alimentar .....	8
2.3 Caracterização microbiológica das matrizes alimentares .....	9
2.3.1 Bactérias.....	10
2.3.2 Fungos .....	16
2.4 Fatores que afetam o crescimento microbiano.....	20
2.4.1 Fatores intrínsecos .....	20
2.4.2 Fatores extrínsecos.....	26
2.5 Processamento térmico.....	28
2.5.1 Esterilização .....	30
2.5.2 Pasteurização .....	30
2.5.3 Fatores que afetam a termorresistência de <i>Bacillus cereus</i> .....	31
2.5.4 Parâmetros associados à pasteurização .....	33
2.6 Microbiologia preditiva.....	35
2.7 Preparados de cereais Frulact .....	37
2.7.1 Processamento Industrial.....	37
2.7.2 Composição e valor nutricional dos preparados de cereais .....	38
2.8 Histórico de ensaios desenvolvidos na Frulact.....	40

Capítulo 3 – Materiais e Métodos.....	43
3.1    Preparação dos meios de cultura.....	43
3.2    Procedimento experimental .....	44
3.2.1    Elaboração dos preparados de cereais .....	44
3.2.2    Preparação do inóculo .....	45
3.2.3    Ingredientação.....	45
3.2.4    Pasteurização .....	46
3.3    Análises microbiológicas.....	47
3.3.1    Quantificação de mesófilos totais .....	47
3.4    Análise de resultados .....	47
Capítulo 4 – Resultados e Discussão.....	49
4.1    Avaliação do impacto dos diferentes binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização na carga microbiana dos preparados de cereais .....	49
4.1.1    Efeito da temperatura na termorresistência bacteriana .....	49
4.2    Avaliação do impacto dos fatores intrínsecos na termorresistência bacteriana .....	56
4.2.1    Efeito da acidez .....	56
4.2.2    Efeito da atividade da água .....	57
4.3    Avaliação do impacto de todos os fatores inerentes ao crescimento microbiano.....	59
Capítulo 5 – Conclusões finais e Recomendações .....	63
Referências bibliográficas.....	65
Anexos .....	71
A – Carga microbiana associada aos binómios de ingredientação .....	71
B – Carga microbiana associada aos binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização .....	74
C – Valores do Teste <i>Anova</i> fator único .....	79
D – Determinação dos parâmetros cinéticos de morte térmica .....	82
E – Efeitos dos fatores intrínsecos.....	86

F – Simulação dos binómios de pasteurização adequados à eliminação de *B.cereus* ..... 87



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema sumário da história da microbiologia. Adaptado de (Custer, 2014; Erkmen & Bozoglu, 2016a; Lelieveld et al., 2005) .....	7
<b>Figura 2.</b> Curva de crescimento microbiano. Retirado de (Correia, 2015).....	10
<b>Figura 3.</b> Ciclo de reprodução de uma bactéria. Adaptado de (Lopes, 2015; Mesquita et al., 2012) .....	12
<b>Figura 4.</b> Formação do endósporo por esporulação. Adaptado de (Tortora et al., 2012) .....	13
<b>Figura 5.</b> Ciclo de vida generalizado dos fungos filamentosos. Retirado de (Mina, 2014). .....	18
<b>Figura 6.</b> Ciclo de vida generalizado das leveduras. Retirado de (Mina, 2014). .....	19
<b>Figura 7.</b> Influência da atividade da água no crescimento bacteriano. Retirado de (Sperber, 1983) .....	21
<b>Figura 8.</b> Esquema ilustrativo dos tratamentos térmicos - Esterilização e Pasteurização. Adaptado de (Simpson, 2009b).....	29
<b>Figura 9.</b> <i>D-value</i> em função do tempo, em minutos, bem como do número de bactérias presentes no alimento. Retirado de (Goff, 2015). .....	34
<b>Figura 10.</b> <i>z-value</i> em função da temperatura e do <i>D-value</i> . Adaptado de (Goff, 2015) .....	35
<b>Figura 11.</b> Esquema representativo da transformação das matérias-primas dos preparados de cereais desde a sua receção até à expedição do produto final. ....	37
<b>Figura 12.</b> Esquema representativo da fase de ingredientação dos preparados de cereais.....	46
<b>Figura 13.</b> Esquema representativo do processamento térmico dos diferentes preparados em estudo. ....	46
<b>Figura 14.</b> <i>Bacillus cereus</i> . Imagem real captada durante a contagem de placas. ....	49
<b>Figura 15.</b> Carga microbiana total obtida em cada um dos binómios de ingredientação às diferentes temperaturas de pasteurização. A - Preparado 1; B - Preparado 2; C - Preparado 3; D - Preparado 4.....	50
<b>Figura 16.</b> Valores de $D_T$ determinados para o Preparado 4 sujeito a diferentes binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização. A – 30 °C/3 h, 80 °C/10 min; B – 30 °C/3 h, 85 °C/10 min; C – 30 °C/3 h, 90 °C/10 min; D – 50 °C/3 h, 80 °C/10 min; E – 50 °C/3 h, 85 °C/10 min; F – 50 °C/3 h, 90 °C/10 min.....	53
<b>Figura 17.</b> Valores de <i>z</i> determinados para o Preparado 4 sujeito a diferentes binómios temperatura /tempo de ingredientação e pasteurização. A – 30 °C/3 h; B – 50 °C/3 h.....	54





## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Condições de crescimento de <i>Bacillus cereus</i> e de produção das suas toxinas. Adaptado de (Food Standards Australia New Zealand, 2013) .....	15
<b>Tabela 2.</b> Classificação dos microrganismos de acordo com o potencial de oxidação-redução. Adaptado de (Baptista & Venâncio, 2003) .....	24
<b>Tabela 3.</b> Gama de temperaturas característica dos diferentes microrganismos. Retirado de (Baptista & Venâncio, 2003) .....	27
<b>Tabela 4.</b> Valor de $D_T$ para diferentes condições de T, pH e $A_w$ de <i>Bacillus cereus</i> . Retirado de (Gaillard et al., 1998; Jay et al., 2005a).....	32
<b>Tabela 5.</b> Composição nutricional do trigo, cevada e aveia. Adaptado de (FAO, 1999b).....	39
<b>Tabela 6.</b> Composição, em percentagem, aproximada dos cereais. Adaptado de (FAO, 1999a; Organic Facts, 2018).....	40
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos em trabalhos anteriores para <i>Bacillus cereus</i> . Adaptado de (Sousa, 2017).....	41
<b>Tabela 8.</b> Características intrínsecas inerentes aos diferentes preparados de cereais .....	44
<b>Tabela 9.</b> Sumário dos valores de $D_T$ e z obtidos para cada um dos preparados de cereais nos diferentes binómios de ingredientação .....	52
<b>Tabela 10.</b> Valores de $D_{90^\circ\text{C}}$ e z obtidos para os Preparados 3 e 4.....	57
<b>Tabela 11.</b> Valores de $D_{90^\circ\text{C}}$ e z obtidos para os preparados 1 e 3 .....	58
<b>Tabela 12.</b> Simulação do binómio temperatura/tempo de pasteurização adequado à eliminação de <i>B.cereus</i> no preparado 3 .....	60
<b>Tabela 13.</b> Simulação do binómio temperatura/tempo de pasteurização adequado à eliminação de <i>B.cereus</i> no preparado 2 .....	61
<b>Tabela A1.</b> Média do logaritmo de UFC/g associada aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização correspondentes ao Preparado 1, acompanhada do desvio padrão respetivo.....	72
<b>Tabela A2.</b> Média do logaritmo de UFC/g associada aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização correspondentes ao Preparado 2, acompanhada do desvio padrão respetivo.....	72

<b>Tabela A3.</b> Média do logaritmo de UFC/g associada aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização correspondentes ao Preparado 3, acompanhada do desvio padrão respetivo.....	73
<b>Tabela A4.</b> Média do logaritmo de UFC/g associada aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização correspondentes ao preparado 4, acompanhada do desvio padrão respetivo.....	74
<b>Tabela B1.</b> Carga microbiana do Preparado 1 calculado através da média do log UFC/g relativamente aos dois ensaios efetuados, acompanhada do desvio-padrão correspondente a cada um dos pontos.....	75
<b>Tabela B2.</b> Carga microbiana do Preparado 2 calculado através da média do log UFC/g relativamente aos dois ensaios efetuados, acompanhada do desvio-padrão correspondente a cada um dos pontos.....	76
<b>Tabela B3.</b> Carga microbiana do Preparado 3 calculado através da média do log UFC/g relativamente aos dois ensaios efetuados, acompanhada do desvio-padrão correspondente a cada um dos pontos.....	77
<b>Tabela B4.</b> Carga microbiana do Preparado 4 calculado através da média do log UFC/g relativamente aos dois ensaios efetuados, acompanhada do desvio-padrão correspondente a cada um dos pontos.....	78
<b>Tabela C1.</b> Resultados da análise estatística do teste "Anova: fator único" entre os binómios de ingredientação do preparado 1 para os valores dentro do limite de deteção da técnica.....	79
<b>Tabela C2.</b> Resultados da análise estatística do teste "Anova: fator único" entre os binómios de ingredientação do preparado 2 para os valores dentro do limite de deteção da técnica.....	79
<b>Tabela C3.</b> Resultados da análise estatística do teste "Anova: fator único" entre os binómios de ingredientação do preparado 3 para os valores dentro do limite de deteção da técnica.....	80
<b>Tabela C4.</b> Resultados da análise estatística do teste "Anova: fator único" entre os binómios de ingredientação do preparado 4 para os valores dentro do limite de deteção da técnica.....	80
<b>Tabela C5.</b> Resultados da análise estatística do teste "Anova: fator único" entre os binómios de ingredientação para todos os valores do preparado 1.....	80
<b>Tabela C6.</b> Resultados da análise estatística do teste "Anova: fator único" entre os binómios de ingredientação para todos os valores do preparado 2.....	81
<b>Tabela C7.</b> Resultados da análise estatística do teste "Anova: fator único" entre os binómios de ingredientação para todos os valores do preparado 3.....	81

<b>Tabela C8.</b> Resultados da análise estatística do teste "Anova: fator único" entre os binómios de ingredientação para todos os valores do preparado 4.....	81
<b>Tabela D1.</b> Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de $D_T$ para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 1, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes.....	82
<b>Tabela D2.</b> Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de $D_T$ para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 2, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes.....	83
<b>Tabela D3.</b> Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de $D_T$ para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 3, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes.....	83
<b>Tabela D4.</b> Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de $D_T$ para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 4, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes.....	84
<b>Tabela D5.</b> Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de $z$ para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 1, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes.....	84
<b>Tabela D6.</b> Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de $z$ para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 2, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes.....	85
<b>Tabela D7.</b> Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de $z$ para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 3, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes.....	85
<b>Tabela D8.</b> Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de $z$ para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 4, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes.....	86
<b>Tabela E1.</b> Valores de $D_{80^\circ\text{C}}$ e $z$ obtidos para os preparados 1 e 2.....	86
<b>Tabela E2.</b> Valores de $D_{80^\circ\text{C}}$ e $z$ obtidos para os preparados 2 e 4.....	87
<b>Tabela F1.</b> Simulação do binómio temperatura/tempo de pasteurização adequado à eliminação de <i>B.cereus</i> no preparado 1.....	87
<b>Tabela F2.</b> Simulação do binómio temperatura/tempo de pasteurização adequado à eliminação de <i>B.cereus</i> no preparado 4.....	87



## Capítulo 1 – Introdução

### 1.1 Motivação e enquadramento do projeto

Atualmente, com a descoberta de novos alimentos e a constante preocupação da população com a saúde, muitas indústrias alimentares consideram necessário e pertinente o estudo de novas metodologias e a análise de novos microrganismos contaminantes. Nesse sentido, estas têm apostado cada vez mais na qualidade e segurança alimentar dos seus produtos, uma vez que estes têm um grande impacto na saúde das populações, provocando muitas vezes (quando os produtos não estão dentro dos limites legais) intoxicações alimentares.

Para colmatar este tipo de problemas a Comissão Europeia alterou Diretivas Comunitárias e promulgou novas regulamentações de forma a acompanhar o avanço do setor alimentar, bem como satisfazer as necessidades do consumidor, implementando de forma segura o processo produtivo. De entre os regulamentos em vigor, atualmente, destacam-se:

- **Regulamento (CE) nº 852/2004** do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios; e o **Regulamento (CE) nº 1019/2008** que altera o anexo II do regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo à higiene dos géneros alimentícios (Parlamento Europeu & Autoridade Europeia, 2004);
- **Regulamento (CE) nº 1441/2007** da comissão de 5 de dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios (Comissão Europeia, 2007);
- **Regulamento (CE) nº 178/2002** do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios (Parlamento Europeu, 2002);

As contaminações alimentares podem advir de diferentes situações durante o processamento alimentar dos produtos, desde a contaminação da matéria-prima no meio ambiente até à chegada ao consumidor final. Estas contaminações normalmente são causadas pela má conservação dos produtos originando alterações físicas, químicas e organolépticas devido à ação de bactérias, fungos e outros microrganismos indesejados (Nerín et al., 2016).

O crescimento desses microrganismos depende de alguns fatores, como a temperatura,  $A_w$ , pH, disponibilidade de nutrientes, presença ou ausência de água e presença de compostos inibitórios, como por exemplo, conservantes. Nesse sentido, diferentes microrganismos necessitam de diferentes condições para atingirem crescimento ótimo (ex.: uns preferem ambientes anaeróbios, outros preferem ambientes frios ou quentes).

Adicionalmente, por vezes o crescimento bacteriano dá-se a elevados valores de pH e  $A_w$ , bem como a baixas temperaturas sob condições anaeróbias. Para além disso, microrganismos que crescem a baixas temperaturas, geralmente são também aeróbios, necessitando de elevados índices de  $A_w$  para obter o crescimento desejado (Lelieveld et al., 2005).

Deste modo, com base nos avanços da tecnologia alimentar, nos dias de hoje, são utilizados diferentes tratamentos que permitem aumentar o tempo de prateleira dos alimentos, bem como para eliminar microrganismos indesejados dos produtos alimentares. De entre os tratamentos usados, o mais comum é o tratamento térmico, nomeadamente, a pasteurização e a esterilização, os quais têm a capacidade de eliminar e controlar o aparecimento destes microrganismos.

No entanto, nem todos os microrganismos são eliminados com estes tratamentos, nomeadamente os denominados microrganismos termorresistentes, alguns deles formadores de esporos, como é o caso de *Bacillus cereus*, o que torna todo o processo de qualidade e segurança alimentar muito mais complexo (Rodrigues, 2016). Nesse sentido, o estudo dos microrganismos termorresistentes nos alimentos é crucial. No caso particular desta dissertação, o estudo de *B. cereus* nos cereais é de elevada relevância tendo em conta os produtos selecionados para o estudo.

Os bolores e as bactérias são organismos capazes de produzir esporos, no entanto os esporos dos bolores são menos resistentes ao calor que os esporos bacterianos. Genericamente, estas estruturas são inativadas através de processamentos térmicos, não só por se revelarem mais eficientes, mas também por serem utilizados pela maioria das indústrias a nível mundial.

Os esporos termorresistentes normalmente sobrevivem aos processos de pasteurização, os quais podem também ser afetados pelo ambiente alimentar em que estão inseridos, como é o caso dos esporos em condições de baixa atividade da água. Nestas condições tornam-se mais resistentes ao calor. Para além disso, se depois da pasteurização, a temperatura de armazenamento bem como as características dos alimentos (pH,  $A_w$ , constituintes alimentares) forem favoráveis ao seu desenvolvimento, durante um certo período de tempo, os esporos podem germinar e crescer atingindo valores elevados ( $10^7$  células/g). Consequentemente pode ocorrer a

deterioração dos alimentos e podem naturalmente surgir doenças a nível alimentar (Simpson, 2009a).

*Clostridium botulinum* é a bactéria formadora de esporos mais perigosa de que há conhecimento a crescer em alimentos refrigerados, seguindo-se o *B. cereus*, que afeta alimentos pasteurizados e refrigerados, causando infeções e intoxicações alimentares (Simpson, 2009a).

As contaminações com microrganismos termorresistentes são bastante comuns na fruta e seus derivados, uma vez que estes se encontram frequentemente em contacto com o solo que constitui a principal fonte de contaminação (Chapman et al., 2007).

Já no caso dos cereais, a sua qualidade e as práticas de pós-colheita na produção têm um papel importante no tempo de prateleira das farinhas.

Os cereais podem ser contaminados por micotoxinas produzidas por fungos e, também por bactérias patogénicas durante o crescimento da cultura, a pré-colheita, a pós-colheita, a secagem, o transporte e o armazenamento. A contaminação afeta de forma adversa a produção de cereais e a qualidade e valor nutricionais das farinhas produzidas. O crescimento de bolores é a causa mais comum da deterioração microbiana e da qualidade dos grãos de cereais, bem como da farinha durante o armazenamento. Alguns estudos mostraram que as micotoxinas (provenientes de fungos tais como, *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Fusarium spp*) e as bactérias patogénicas (*Salmonella spp*, *B. cereus*) podem contaminar a farinha, incluindo os seus produtos, e os níveis de contaminação são influenciados pelas condições climáticas durante os processos de maturação e colheita dos cereais (Victor et al., 2013).

Para além disso, também a nível industrial podem ocorrer contaminações, embora haja mais restrições a nível da qualidade estas podem ocorrer na fase de colheita do produto, no armazenamento, o qual pode ser inadequado, bem como no tratamento térmico inadequado se for usado um binómio de temperatura/tempo desadequado ao produto em questão. Por estas razões é sempre importante fazer uma avaliação adequada dos ensaios efetuados, assim como repetir aqueles que forem necessários para que se atinjam os resultados desejados.

Neste sentido, o presente projeto visou o estudo da bactéria mesófila formadora de esporos, *B. cereus*, quando sujeita a condições distintas de Aw e pH. Adicionalmente, este microrganismo também foi sujeito a diferentes condições de temperatura e tempo, permitindo assim avaliar o seu comportamento com diferentes binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização.

## 1.2 Apresentação da empresa

O presente projeto foi desenvolvido na Frulact – Ingredientes para a Indústria Alimentar, S.A. sita na cidade da Maia, mais concretamente em Gemunde.

A Frulact é um grupo empresarial presidido por João Miranda e fundado pelo seu pai, Comendador Arménio Miranda, o qual trabalhava na Longa Vida quando certo dia propôs aos seus filhos (João Miranda e Francisco Miranda) abrir uma empresa para comercializar a chila e o caramelo que a Longa Vida utilizava nos iogurtes.

Assim, em 1987 é fundada a Frulact no fundo do quintal de uma moradia em Leça, a qual hoje em dia é conhecida por atuar no setor das agroindustriais frutícolas. A sua principal atividade assenta no fabrico de preparados de fruta para indústrias de laticínios, pastelaria industrial, gelados e bebidas.

Cinco anos depois, em 1992, a empresa decidiu arriscar na construção de uma fábrica moderna na zona industrial da Maia e pouco tempo depois surgiu a unidade de transformação de fruta em Ferro. Tendo já afirmado a sua posição em Portugal, em 1995 surgiu a primeira oportunidade de internacionalização no Norte de África, Kenitra, a 60 quilómetros de Rabat. No entanto, esta investida não foi bem sucedida, e em 2000 a empresa decidiu instalar-se na Tunísia com o objetivo de fornecer a indústria de laticínios do Médio Oriente.

Mais tarde, em 2006, a Frulact ganhou uma grande dimensão produtiva devido à aquisição da unidade fabril de Vichy, em França, e da entrada em produção da fábrica de Tortosendo. Nos anos seguintes, a empresa foi expandido no mercado europeu e africano, e aliou a estes o continente norte-americano, nomeadamente a unidade no Canadá (Fernandes, 2013).

Para sustentar as suas estratégias a Frulact tem investido, em quantidade e qualidade, nos recursos estruturais fundamentais nomeadamente instalações industriais, tecnologias modernas, processos baseados nas melhores práticas e recursos humanos competentes e qualificados, servindo diretamente grandes clientes e marcas mundiais e locais, tais como DANONE, NESTLÉ, YOPLAIT, SENOBLE, PASCUAL, LACTALIS-PRESIDENT, NOVANDIE, EMMI, IPARLAT, LACTOGAL, UNILEVER, entre outros (COTEC, 2013).

Atualmente, a Frulact gere cerca de 900 referências em produtos acabados e 2500 matérias-primas alimentares dando os primeiros passos com as suas próprias marcas Fru, Fru - Fruits For You e Benefit e começando a fazer, para as chamadas marcas de distribuição para grandes



empresas mundiais, produtos fabricados a partir da fruta como sumos, compotas, doces e *baby food* (Fernandes, 2013).

Adicionalmente, o reflexo do sucesso da Frulact é evidenciado nos prémios que tem recebido, nomeadamente, PME-Excelência (IAPMEI/CGD), Prémio Inovação 2003 (Ministério da Agricultura e Pescas) e Óscar da Exportação 2005 (Câmara de Comércio Luso-Francesa), tendo ainda obtido menções honrosas do INSEAD 2006 e do Empreendedor do Ano *Ernst & Young/Fortis Bank* 2006. Mais recentemente, em 2013, a empresa foi considerada a melhor empresa do ano pelo Jornal de Negócios e a PwC, fazendo, tudo isto, da Frulact uma das 5 principais empresas europeias do setor.

Para além disso, muito recentemente, a Frulact com vista a mais uma vez inovar e ser uma marca na vanguarda, adquiriu uma *start-up* de base vegetal, 5Ensesinfood, produtora de ingredientes de base vegetal para a indústria alimentar. Esta aquisição tem como objetivo acompanhar os novos hábitos alimentares dos consumidores que consomem cada vez menos leite e seus derivados (Neves, 2018).

A empresa possui ainda um Núcleo de Investigação certificado pela Agência Nacional de Inovação (ANI) – NITEC-FRUTECH – e gere como *project leader* diversos programas de I&D e Inovação, nacionais e internacionais, aprovados e apoiados pela ANI em conjunto com Universidades e outros Institutos de Investigação Científica (COTEC, 2013). Nesse sentido, tendo em vista o sucesso na inovação e na criação de novos produtos, a Frulact propôs-me um trabalho de investigação na área da microbiologia alimentar em colaboração com a Universidade do Minho.

### 1.3 Objetivos do projeto

O objetivo deste projeto consistiu na avaliação do comportamento microbiano da bactéria *B. cereus* em preparados de cereais quando exposta a diferentes binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização, bem como condições de atividade da água ( $A_w$ ) e pH distintas.

A etapa de ingredientação constitui uma das etapas com maior influência no desenvolvimento e termorresistência da carga microbiana. Ou seja, o tempo de permanência do preparado nesta etapa deverá ser controlado rigorosamente para que a carga microbiana não se desenvolva e não coloque em risco a eficácia do binómio temperatura/tempo selecionado para o processamento térmico posterior (pasteurização). Assim, a avaliação da carga microbiana durante a etapa de ingredientação teve como principal objetivo entender o seu impacto na definição dos parâmetros que garantem um tratamento térmico posterior eficaz.

Adicionalmente, pretendeu-se também determinar as curvas de morte térmica do microrganismo termorresistente em estudo, ou seja, determinar o tempo necessário para uma dada temperatura destruir 90% da população -  $D_T$ - e o intervalo de temperatura necessário para alterar o  $D_T$  um ciclo logarítmico -  $z$ .

Por fim, foram selecionados os binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização adequados para a eliminação de *B. cereus* em preparados de cereais.

#### 1.4 Organização da dissertação

A presente dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos, sendo que o primeiro capítulo diz respeito à introdução, onde consta o enquadramento do projeto, a apresentação da empresa e os objetivos do projeto.

O capítulo dois aborda os fundamentos teóricos do projeto, apresentando a revisão da literatura que sumariza estudos feitos previamente os quais se relacionam com os objetivos deste trabalho e que o suportam cientificamente.

O capítulo três consiste na descrição dos materiais e métodos usados aquando da realização deste trabalho experimental, incluindo o procedimento experimental inerente às análises microbiológicas.

Seguidamente, no capítulo quatro são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos.

Por último, no capítulo cinco encontram-se as conclusões do trabalho, bem como as limitações e recomendações para futuros desenvolvimentos.

## Capítulo 2 – Fundamentos teóricos do projeto

### 2.1 Conceito de microbiologia alimentar

A microbiologia é o ramo da ciência biológica que lida com microrganismos que são invisíveis a olho nu. Esta é uma importante área para que se possa entender a mais pequena de todas as vidas biológicas. Excetuando poucos alimentos estéreis, praticamente todos os alimentos contêm um ou mais tipos de microrganismos, sendo que alguns deles conferem características desejáveis aos alimentos, como por exemplo a produção de alimentos fermentados. No entanto, outros microrganismos causam deterioração nos alimentos e são responsáveis por doenças gastrointestinais.

Para estudar e controlar, quando necessário, o papel dos microrganismos presentes nos alimentos, torna-se importante isolá-los numa cultura pura e avaliar as suas características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas, avaliação essa que só é possível graças às descobertas realizadas anteriormente pelos cientistas destacados na Figura 1.

Robert Hook (1664)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Descreveu a estrutura dos bolores.</li></ul>
Nicholas Appert e Peter Durand (1800)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Introduziu o conceito de conservas e processamento térmico.</li></ul>
Theodor Schwann (1837)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Descobriu que as leveduras responsáveis pela conversão dos açúcares em álcool.</li></ul>
Ehrenberg (1838)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Introduziu o conceito de bactéria e descobriu cerca de 16 espécies bacterianas.</li></ul>
Louis Pasteur (1857-1862)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Desenvolveu as técnicas de assepsia;</li><li>• Descobriu que alguns microrganismos são anaeróbios;</li><li>• Inativação de microrganismos através da aplicação de calor.</li></ul>
Ferdinand Cohn (1875)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Desenvolveu o sistema de classificação preliminar de bactérias;</li><li>• Descobriu as bactérias formadoras de esporos.</li></ul>
John Tyndall (1877)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Constatou que algumas bactérias são capazes de produzir estruturas resistentes, inativando-as através de várias séries de aquecimento e refrigeração.</li></ul>

**Figura 1.** Esquema sumário da história da microbiologia. Adaptado de (Custer, 2014; Erkmen & Bozoglu, 2016a; Lelieveld et al., 2005)

Antes de todas estas descobertas, as populações já tinham conhecimento empírico sobre a deterioração alimentar e as fermentações que ocorrem nos alimentos. Adicionalmente, mesmo antes de se descobrirem as atuais formas de conservação, descobriu-se que a salga e a secagem preservam os alimentos, tendo sido a partir destes hábitos que se vieram a desenvolver métodos mais creíveis e robustos.

É de notar que todas as técnicas de preservação de alimentos originam algum tipo de efeito pela manipulação de um ou mais fatores intrínsecos e/ou extrínsecos que condicionam o desenvolvimento de microrganismos, diminuindo o crescimento microbiano e eliminando microrganismos. Quando o crescimento microbiano é diminuído, o tempo de prateleira do produto em questão é alargado. No entanto, é importante ter em conta que as técnicas de preservação dos alimentos podem ter um impacto drástico na sua qualidade, nomeadamente as suas características organoléticas (Erkmen & Bozoglu, 2016a).

## 2.2 Higiene e segurança alimentar

Os problemas de saúde pública decorrentes de doenças a nível alimentar surgiram com mais impacto no século XIX, anos depois dos microrganismos terem sido considerados agentes infecciosos (Lelieveld et al., 2005).

A maior parte das doenças a nível alimentar estão mais relacionadas com os microrganismos patogénicos do que com contaminações físicas e/ou químicas. Como as contaminações microbianas geralmente são indetetáveis pelos sentidos humanos (quando em baixas concentrações) estas são, também, capazes de crescer rapidamente sob condições de armazenamento favoráveis ao seu desenvolvimento, tornando-se um desafio o seu controlo e eliminação. Contudo, mesmo que durante o processamento térmico os microrganismos sejam destruídos, provavelmente estes já produziram toxinas e, por isso as boas práticas de higiene e segurança são vitais para prevenir contaminações.

A higiene no processamento alimentar começou com a introdução de algumas medidas, incluindo limpeza e desinfeção, prevenção de recontaminação e tratamento térmico dos produtos alimentares, eliminando os agentes patogénicos. Este tratamento térmico foi introduzido por Nicholas Appert e Peter Durand no processamento alimentar mesmo antes das causas por detrás das doenças alimentares serem conhecidas (Lelieveld et al., 2005).

Conseqüentemente, pelas sucessivas crises que têm posto em causa a segurança e saúde dos consumidores, o setor alimentar tem vindo a ser alvo de maior controlo, quer seja pelas autoridades competentes e pelo exigente quadro de regulamentação e legislação aplicável, quer seja, e sobretudo, pelos consumidores que impõem às organizações ritmos de resposta cada vez mais rápidos e eficazes. No entanto, as organizações mais responsáveis e capazes vão evoluindo internamente e aplicando sistemas de monitorização e controlo que lhes permitam identificar e atuar sobre situações de perigo, antes destas efetivamente acontecerem.

Nesse sentido, os sistemas de segurança alimentar têm evoluído de forma muito favorável, e atualmente a reconhecida abordagem HACCP, encontra-se espelhada num requisito legal suportado pelo Regulamento (CE) nº 852/2004 (Silva, 2017). Esta metodologia é baseada nos princípios e conceitos preventivos e assenta numa abordagem sistemática, que pretende assegurar o controlo eficiente através da identificação de etapas (“pontos”) críticas, gerindo as potenciais fontes de contaminação e crescimento microbiano, desde o ponto de produção até à sua utilização. Este sistema enfatiza a monitorização da qualidade dos ingredientes dos produtos alimentares em pontos críticos do processo de manuseamento (Portal de Segurança Alimentar, 2014). Para além disso, o *Codex Alimentarius* tem vindo a ser o referencial de certificação para muitas organizações (Silva, 2017). Como parte deste sistema, foram estabelecidos limites microbiológicos numa grande variedade de produtos alimentares, quer durante a sua preparação, quer enquanto produto final.

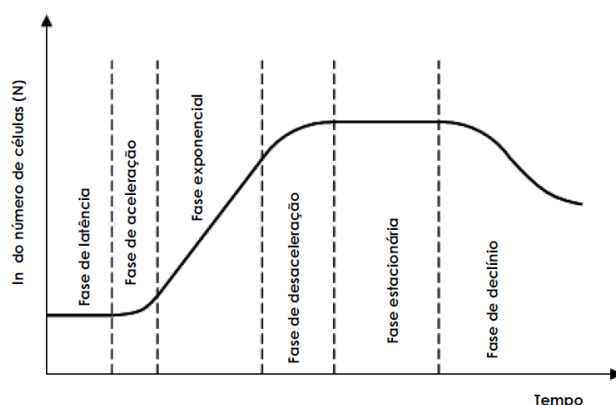
### 2.3 Caracterização microbiológica das matrizes alimentares

De entre os microrganismos existentes, alguns contribuem de forma benéfica para a qualidade, segurança e processamento de produtos alimentares, por exemplo, as leveduras. No entanto, outros são responsáveis pela deterioração dos alimentos e, conseqüentemente por doenças de origem alimentar, uma vez que estão envolvidos em processos que causam efeitos nocivos nos próprios alimentos, ou na saúde dos consumidores. A vigilância microbiológica dos produtos alimentares corresponde a um importante ponto da qualidade e segurança alimentar, assim como a implementação de medidas preventivas, tais como o cumprimento do Manual de Boas Práticas, juntamente com a aplicação da Análise de Perigos e Pontos Controlo Críticos (HACCP) (Santos et al., 2005).

Por estes motivos é importante o estudo dos diferentes microrganismos, bem como o conhecimento das características intrínsecas, tais como a  $A_w$  e acidez, de cada tipo de microrganismo, quer seja de origem bacteriana, quer seja de origem parasítica. Nas próximas subseções irão ser abordadas as características das bactérias e fungos, uma vez que são os microrganismos mais presentes em preparados de fruta e cereais (objeto de estudo no presente projeto), de forma a perceber os fatores que levam à sua propagação nos alimentos durante as várias fases do processamento alimentar.

Adicionalmente, é importante ter em conta que a remineralização com certos minerais tem um efeito protetor nas bactérias, aumentando a sua resistência térmica através da diminuição da  $A_w$ . Para além disso, a idade das células, a quantidade de células, a desidratação dos protoplastos e a temperatura de esporulação podem afetar a resistência térmica do microrganismo.

É de notar que, geralmente as células vegetativas termofílicas e as bactérias formadoras de endósporos são mais resistentes à temperatura durante a fase estacionária de crescimento do que durante a fase logarítmica (Figura 2) notando-se um aumento, seguido de estabilização do número de células na fase estacionária. (Steyn et al., 2011).



**Figura 2.** Curva de crescimento microbiano. Retirado de (Correia, 2015).

### 2.3.1 Bactérias

Bactérias (do latim, bactéria, singular: *bacterium*) caracterizam-se por serem organismos relativamente simples com uma única célula (unicelulares). Devido ao facto do seu material genético não estar envolto por uma membrana celular, as células bacterianas são chamadas de procaríotas, onde estão também incluídas as bactérias e as arqueobactérias (Tortora et al., 2012).

Apesar de existirem milhares de espécies bacterianas, os organismos isolados apresentam uma das três formas gerais: elipsoidal ou esférica, denominados cocos; cilíndrica ou em bastonete, designados de bacilos; e espiralada ou helicoidal. Na sua maioria, as bactérias medem entre 0.5 e 1.0  $\mu\text{m}$  por 2 a 5  $\mu\text{m}$ . No entanto, existem algumas formas filamentosas que são capazes de provocar doenças no homem, cujo comprimento pode atingir os 100  $\mu\text{m}$ , denominadas de bactérias patogénicas.

Como qualquer microrganismo, também as bactérias se encontram espalhadas no meio ambiente, podendo ser transportadas pela água, vento, animais, plantas e até mesmo, pelo Homem.

Quando em contacto com um alimento, estas só se propagam caso encontrem condições mínimas de sobrevivência, levando ao desenvolvimento microbiano, e podendo resultar na deterioração do alimento, devido à multiplicação bacteriana através da divisão celular. As bactérias normalmente desenvolvem-se em ambientes com grande abundância de água, ou seja, em ambientes com elevada  $A_w$ , preferindo, geralmente, ambientes com pH neutro. Relativamente à temperatura ótima de crescimento, estas preferem temperaturas entre os 20 °C e os 45 °C (mesófilas). Inclusivamente, existem algumas bactérias que conseguem crescer à temperatura de refrigeração ou temperaturas acima de 45 °C, sendo nestas condições, o crescimento bacteriano, mais lento.

Existem 4 tipos de bactérias:

- Aeróbias – desenvolvem-se apenas na presença de ar;
- Anaeróbias – desenvolvem-se apenas na ausência de ar;
- Aeróbias facultativas – podem crescer com ou sem ar;
- Microaerófilas – necessitam de uma baixa concentração de ar para se desenvolverem.

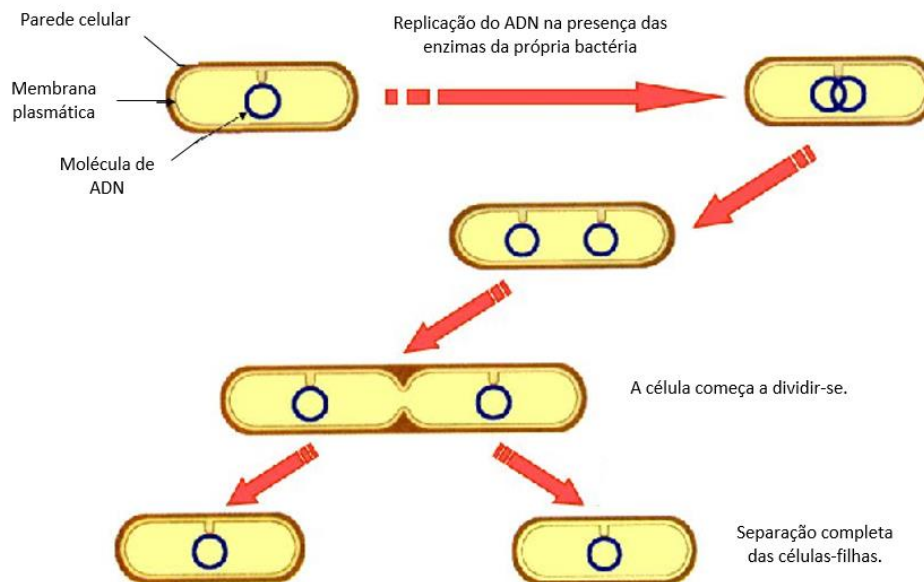
Para além das bactérias em si, estas podem formar estruturas mais resistentes, designadas de esporos, formação essa que pode ocorrer quando as condições se tornam desfavoráveis para o crescimento bacteriano, sendo no fim da fase exponencial da curva de crescimento das células vegetativas, sob condições de depleção de nutrientes, que são produzidos nos endósporos. Os esporos são caracterizados por apresentarem elevada resistência ao calor, daí estarem incluídos no grupo de microrganismos termorresistentes, tais como os membros dos géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus* e *Dessulfotomaculum*, que produzem estas estruturas no interior das células (Azevedo & Sunkel, 2012).

Como seria de esperar, nem todas as bactérias produzem esporos, sendo que aquelas que normalmente afetam negativamente os alimentos pertencem aos géneros *Bacillus* e *Clostridium* (Baptista & Venâncio, 2003).

#### 2.3.1.1 *Ciclo de vida das bactérias*

A reprodução das bactérias, representada na Figura 3, é autónoma e dá-se, geralmente, por divisão binária. De seguida, realiza-se a replicação do ADN, separando-se as duas cópias e afastando-se em sentidos opostos. Posteriormente, dá-se a invaginação da membrana celular para o interior da célula, formando uma dupla camada a meio da mesma, ocorrendo assim a divisão do citoplasma. Deste modo, forma-se, então, uma parede celular entre as duas membranas celulares.

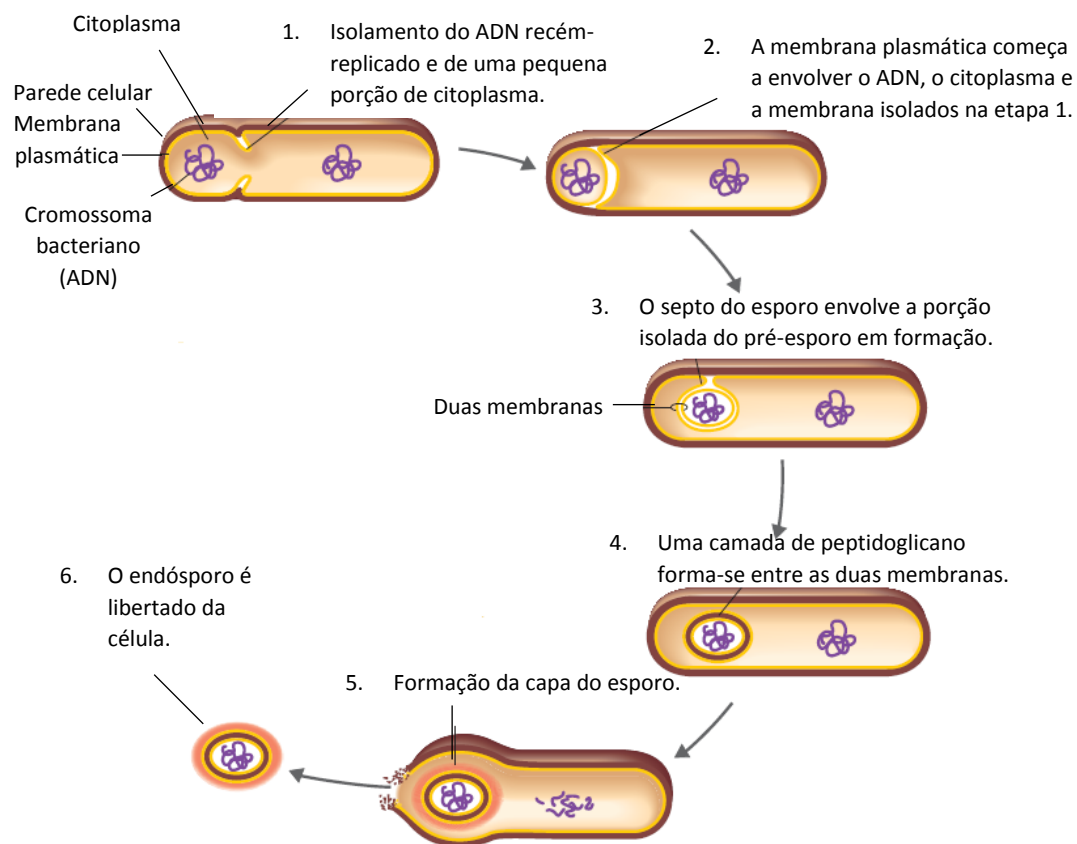
Para além disso, os plasmídeos também se replicam separadamente, recebendo cada célula-filha das bactérias que os contêm, cópias desses plasmídeos. Posteriormente, as células filhas separam-se, crescem, e voltam a dividir-se, dando-se normalmente uma divisão em cada 20-25 minutos (Mesquita et al., 2012).



**Figura 3.** Ciclo de reprodução de uma bactéria. Adaptado de (Lopes, 2015; Mesquita et al., 2012)



A esporulação, ilustrada na Figura 4, é um processo de diferenciação bioquímica, que ocorre sob controlo genético e envolve a produção de novas estruturas, metabolitos e enzimas. Concretamente, os endósporos caracterizam-se por serem estruturas complexas rodeadas por um invólucro constituído por várias camadas, sendo que as mais externas são ricas em proteínas, com elevado teor de aminoácidos contendo grupos sulfidrílo. A camada mais interna, o córtex, cujo principal constituinte é um tipo invulgar de peptidoglicano, que relativamente ao peptidoglicano da parede apresenta uma quantidade reduzida de pontes interpetídicas. Quanto à parte central do endósporo, esta é constituída pelo protoplasto rodeado pela parede celular germinativa (com peptidoglicano) (Azevedo & Sunkel, 2012).



**Figura 4.** Formação do endósporo por esporulação. Adaptado de (Tortora et al., 2012)

Para além disso, pensa-se que a invulgar resistência destas estruturas ao calor, por um lado está relacionada com o seu estado de desidratação (baixos valores de  $A_w$ ) e, por outro lado com a presença em grandes quantidades de dipicolinato de cálcio, no protoplasto, que está ausente nas células vegetativas (Azevedo & Sunkel, 2012).

### 2.3.1.2 Principais contaminantes dos cereais

Os cereais e produtos derivados de cereais são importantes como fonte alimentar para o desenvolvimento humano em todo o Mundo, sendo que os mais consumidos são o milho, o trigo, a cevada, o arroz, a aveia e o centeio. Devido ao seu uso comum por parte das populações, a área da microbiologia e da segurança alimentar torna-se muito importante para o controlo dos produtos derivados destas matérias-primas (Bullerman & Bianchini, 2011; Erkmen & Bozoglu, 2016b).

São vastas as fontes de contaminação microbiana dos cereais, no entanto todas elas estão relacionadas com o seu contacto com o meio ambiente, uma vez que estes crescem, são colhidos e processados sempre em contacto com o ambiente que os rodeia e, por isso a probabilidade de contaminação enquanto estão a ser manuseados é muito maior. Posto isto, os microrganismos contaminantes dos cereais podem ser provenientes do (1) ar; (2) poeiras; (3) solo; (4) água; (5) animais; (6) contentores de transporte e armazenamento e; (7) manuseamento e equipamentos de processamento dos cereais. Para além destas fontes de contaminação, existem vários fatores que desencadeiam a contaminação microbiana, como por exemplo, (1) chuvas; (2) secas; (3) humidade; (4) temperatura; (5) vento, entre outros.

A microflora dos cereais e seus derivados é variada e inclui bolores, leveduras e bactérias (psicrófilos, mesófilos e termófilos), bactérias ácido-láticas, bactérias formadoras de esporos (*Bacillus spp.*), microrganismos patogénicos, coliformes e *Enterococci*.

Os microrganismos patogénicos que normalmente contaminam os cereais e causam problemas aos seus consumidores incluem (1) *B. cereus*; (2) *Clostridium botulinum*; (3) *Clostridium perfringens*; (4) *Escherichia coli*; (5) *Salmonella*; e (6) *Staphylococcus aureus* (Bullerman & Bianchini, 2011). De entre estes, irá ser dado destaque no ponto seguinte à bactéria *B. cereus*, tendo em conta que se trata do objeto de estudo no presente projeto.

### 2.3.1.3 *Bacillus cereus*

Normalmente, os grãos e produtos à base de cereais contém alguns géneros de bactérias, bolores e leveduras. Fungos, especialmente bolores, são predominantes na microflora natural dos grãos, sendo que a maior parte da deterioração microbiana nos cereais é causada por bolores. Para além disso, as bactérias também são responsáveis pela deterioração microbiana nos cereais,

sendo que as famílias mais comuns associadas a este flagelo são *Bacillaceae*, *Micrococcaceae*, *Lactobacillaceae* e *Pseudomonadaceae* (Erkmen & Bozoglu, 2016b).

Destas, a família *Bacillaceae*, à qual pertence o género *Bacillus* destaca-se pela sua predominância nestes produtos (Cortés-Sánchez et al., 2017). Decorrente deste género, existe uma subdivisão denominada *Bacillus cereus sensu lato*, a qual compreende 12 espécies estritamente relacionadas nomeadamente, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycooides*, entre outros. Os membros deste grupo caracterizam-se por serem anaeróbios facultativos e formadores de esporos que estão igualmente distribuídos pelo ambiente. Comparativamente a outras espécies deste grupo, *B. anthracis* e *B. cereus* tem sido largamente estudados devido aos seus graus de patogenicidade (Liu et al., 2017).

Em particular, *B. cereus* foi descrita pela primeira vez em 1887 (Voort, 2008) e caracteriza-se por ser uma bactéria gram-positiva, com 1-12 µm de diâmetro e 3.5 µm de largura (Cortés-Sánchez et al., 2017), aeróbia facultativa, formadora de esporos com forma de bastonete. Para além disso, está maioritariamente presente nos solos, onde pode completar o seu ciclo de vida saprófito e, como resultado desse ciclo pode ser encontrada na água e em vegetais, entre outros alimentos (Duport et al., 2016). Na Tabela 1 é possível observar as condições ótimas e a gama de crescimento desta bactéria, bem como as condições ótimas para a produção de toxinas.

**Tabela 1.** Condições de crescimento de *Bacillus cereus* e de produção das suas toxinas. Adaptado de (Food Standards Australia New Zealand, 2013)

	Crescimento bacteriano		Produção de toxina emética		Produção da toxina causadora de diarreia	
	Ótimo	Gama	Ótimo	Gama	Ótimo	Gama
<b>Temperatura (°C)</b>	30 a 40	4 a 55	12 a 15	12 a 37	32	10 a 43
<b>pH</b>	6.0 a 7.0	4.9 a 10.0	-	-	8.0	5.5 a 10.0
<b>Atividade da água</b>	-	0.93 a 0.99	-	-	-	-

Para além destas características associadas ao crescimento de *B. cereus*, esta também é reconhecida por crescer na presença de concentrações de NaCl na ordem dos 7% (Cortés-Sánchez et al., 2017).

É de salientar que, tal como foi dito anteriormente, uma das características mais interessantes associada a esta bactéria é a sua capacidade formar esporos, os quais estão metabolicamente inativos e são extremamente resistentes a condições como a congelação, o aquecimento, a secagem, a radiação e a escassez de nutrientes (Voort, 2008).

Adicionalmente, *B. cereus* é conhecida por causar dois tipos de doenças, doença emética e diarreia (Tabela 1), sendo que a primeira se trata de uma intoxicação causada pela ingestão de toxina cereulide, a qual é pré-formada nos alimentos durante o crescimento de *B. cereus*. Normalmente, esta doença causa náuseas, vômitos e dor abdominal, 1 - 5 horas depois da ingestão, fixando-se a recuperação entre as 6 - 24 horas seguintes. A diarreia é causada por enterotoxinas produzidas pela bactéria dentro do hospedeiro. O período de incubação, neste caso ocorre entre 8 - 16 horas, e os sintomas prevalecem durante 12 - 14 horas, com probabilidade de se prolongarem durante dias (Food Standards Australia New Zealand, 2013).

Por estes motivos, esta bactéria mesófila formadora de esporos tem-se revelado uma grande preocupação em várias indústrias, uma vez que demonstra variações consideráveis de resistência térmica. Na indústria do leite desnatado existem vários valores de  $D_T$  associados à destruição de 90% desta população ( $D_{90^\circ\text{C}} = 4.4 - 6.6$  min) e para os esporos do leite desnatado e alimentos pouco ácidos ( $\text{pH} > 4.5$ ) têm-se obtido valores de  $D_{100^\circ\text{C}} = 2.7 - 5$  min. Para além desta indústria, também a indústria das conservas sofre com este flagelo, havendo relatos de valores de  $D_{95^\circ\text{C}}$  de 250 minutos (te Giffel & Beumer, 1999).

### 2.3.2 Fungos

Os fungos, família à qual pertencem as leveduras e os bolores, não crescem tão rápido quanto as bactérias em alimentos com pouca acidez ( $\text{pH} > 4.6$ ) e com elevada atividade da água ( $A_w$ ), e por isso nem sempre constituem um perigo. O mesmo já não acontece em alimentos ácidos e com baixa  $A_w$ , como é o caso dos frutos e sumos de frutos, vegetais, queijos, cereais, alimentos salgados, acidificados e secos (Baptista & Venâncio, 2003).

A propagação destas espécies agrava-se quando ocorre a produção de micotoxinas, que tal como o nome indica, são tóxicas e quando consumidas podem causar graves doenças, e em casos extremos pode levar à morte do consumidor. Por isso, para reduzir o risco de contaminação por estes elementos torna-se relevante a implementação de boas práticas de higiene em todas as

fases do processo, nomeadamente na etapa de armazenamento, diminuindo o seu tempo de armazenamento e respeitando os tempos de refrigeração ou congelação, reduzindo o contacto dos alimentos com o ar, destruindo as células vegetativas e esporos por tratamento térmico e, adicionando ácidos e conservantes para aumentar o tempo de vida útil dos mesmos.

No caso das leveduras, estas apenas são responsáveis pela deterioração de alimentos onde se instalam, não constituindo um problema de segurança sanitária. Não tendo um risco de contaminação elevado, muitas vezes podem ser utilizadas como indicadores das condições de higiene numa unidade industrial, ou seja as leveduras são utilizadas como “marcadores”, onde excedidos os limites legais permitidos, indicam que muito provavelmente ocorreu contaminação por parte de microrganismos patogénicos ecologicamente similares, bem como a ocorrência de um processamento inadequado ou má qualidade das matérias-primas (Baptista & Venâncio, 2003; Halkman & Halkman, 2014). Por exemplo, numa indústria em que se processem alimentos ácidos, são indicadores de higiene geral insuficiente as leveduras *Geotrichum candidum* e *Trichosporon spp.* bem como são indicadores de planos de limpeza ineficientes as leveduras *Pichia anomala* e *Pichia membranaefaciens*. (Baptista & Venâncio, 2003). No entanto, espécies de *Zygosaccharomyces* e géneros relacionados são normalmente leveduras que colonizam e deterioram produtos com grandes concentrações do açúcar e sal. De entre este género, existem seis espécies das quais, *Z. bailii*, *Z. bisporus* e *Z. rouxii* se destacam por serem as que mais afetam alimentos e bebidas. Estas leveduras são caracterizadas pela deterioração fermentativa de produtos, tais como sumos de fruta, concentrados de fruta, xaropes, molhos, bebidas alcoólicas, mel e compotas. A natureza fermentativa do metabolismo de *Zygosaccharomyces* produz dióxido de carbono que constitui uma preocupação nos casos em que os alimentos estão selados, uma vez que a acumulação de gás nas embalagens pode levar à sua explosão. A propagação destas leveduras pode levar à produção de metabolitos secundários e conseqüentemente à alteração das características organolépticas dos produtos (Petruzzi et al., 2016)

Já a presença de bolores e fungos filamentosos é considerada bastante natural em cereais e hortofrutícolas, sendo que antes do amadurecimento dos cereais, os bolores típicos nestes produtos são espécies dos géneros *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium*. Durante o armazenamento passam a dominar os fungos das espécies *Aspergillus* e *Penicillium* e, após longos períodos de armazenamento, dominam *Papulspora spp.*, *Sordaria spp.*, *Fusarium graminearum* e *Mucors*. O grande perigo associado à presença destes fungos, principalmente os

gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, é facto destes produzirem micotoxinas e contaminarem os cereais (Baptista & Venâncio, 2003).

### 2.3.2.1 Ciclo de vida dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos podem reproduzir-se assexuadamente pela fragmentação das suas hifas. Para além disso, tanto a reprodução sexuada como a assexuada em fungos ocorre pela formação de esporos, sendo os fungos normalmente identificados pelo tipo de esporo. No entanto, os esporos provenientes dos fungos (formação de um endósporo a partir da separação da célula mãe levando à germinação) são completamente diferentes daqueles que são produzidos pelas bactérias (formação de um endósporo a partir de uma única célula vegetativa).

De uma forma geral, os esporos são formados a partir das hifas aéreas de diferentes formas, dependendo da espécie, podendo ser assexuais ou sexuais. Os assexuais são formados pelas hifas de um organismo, sendo que quando esses esporos germinam, tornam-se organismos geneticamente idênticos à célula-mãe. Quanto aos sexuais, estes resultam da fusão de núcleos de duas linhagens opostas de cruzamento de uma mesma espécie do fungo. Note-se que os fungos produzem esporos sexuais com menos frequência que esporos assexuais. Na Figura 5 encontra-se esquematizado o ciclo de vida generalizado dos fungos, onde estão representadas ambas as reproduções, assexuada e sexuada (Mina, 2014; Tortora et al., 2012).

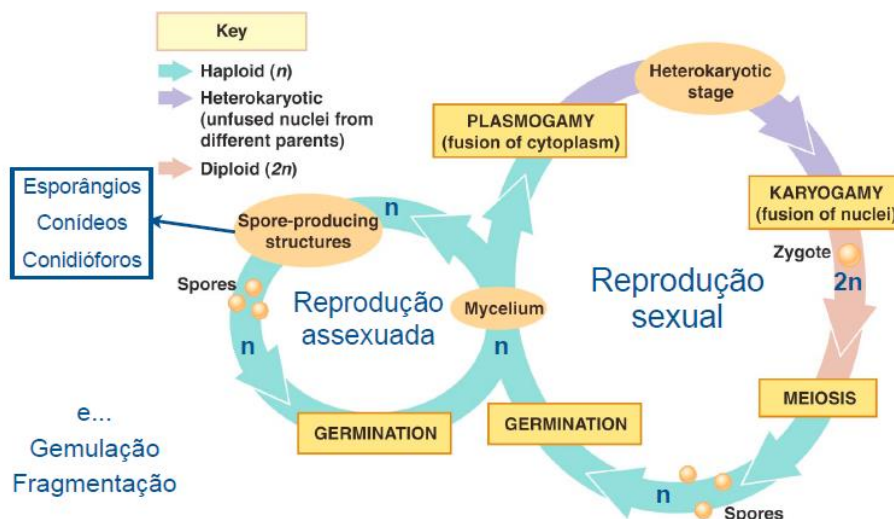


Figura 5. Ciclo de vida generalizado dos fungos filamentosos. Retirado de (Mina, 2014).

### 2.3.2.2 Ciclo de vida das leveduras

As leveduras, tal como referido anteriormente, fazem parte da família dos fungos sendo seres unicelulares, não filamentosos, tipicamente esféricos ou ovais. Tal como os fungos, também as leveduras são amplamente distribuídas pela natureza, encontrando-se com frequência como um pó branco que cobre as frutas e folhas. Estas são capazes de crescer em ambientes anaeróbios facultativos, podendo utilizar o oxigénio ou um composto orgânico como aceitador final de eletrões, sendo este um atributo importante uma vez que lhes permite sobreviver em diferentes ambientes. Para além disso, se houver acesso a oxigénio, estas adotam crescimento aeróbio para metabolizar hidratos de carbono formando dióxido de carbono e água; na ausência de oxigénio, fermentam os hidratos de carbono e produzem etanol e dióxido de carbono, originando a produção de bebidas alcoólicas.

As leveduras podem ser produzidas por cissiparidade ou por fissão como as *Saccharomyces* e as *Schizosaccharomyces*, respetivamente. A partir da cissiparidade, uma célula de levedura pode produzir mais de 24 células-filhas, podendo formar pseudo-hifas. Enquanto que, por fissão a célula de levedura divide-se produzindo duas novas células iguais

Na Figura 6, encontra-se esquematizado o ciclo de vida das leveduras generalizado (Tortora et al., 2012).

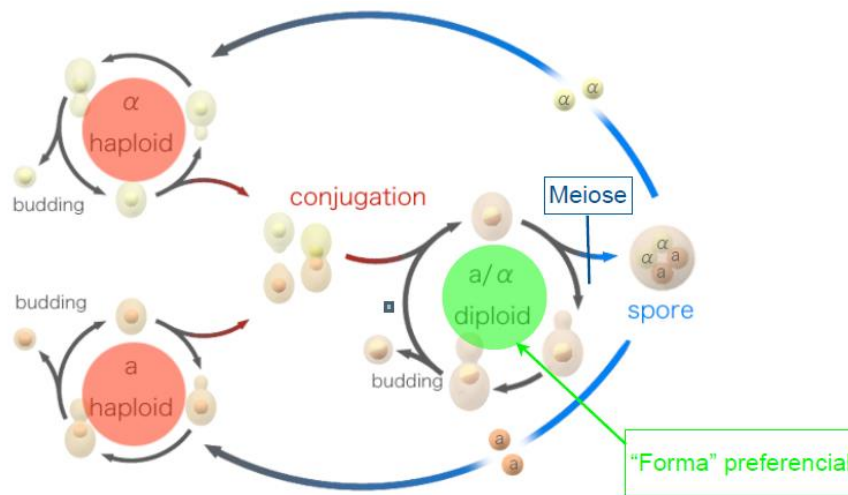


Figura 6. Ciclo de vida generalizado das leveduras. Retirado de (Mina, 2014).

## 2.4 Fatores que afetam o crescimento microbiano

Atualmente, o estudo das condições ótimas para a propagação de microrganismos e dos fatores que afetam o seu crescimento, revelam-se um tópico de extrema importância devido ao facto de se consumirem diariamente produtos alimentares de origens animal e vegetal. Nesse sentido, os fatores que afetam o crescimento microbiano dividem-se em duas categorias: fatores intrínsecos e extrínsecos. De entre os fatores intrínsecos são de salientar (1) a atividade da água ( $A_w$ ); (2) a acidez; (3) o potencial oxidação-redução; (4) a composição química do alimento; (5) a estrutura biológica do alimento; e (6) as substâncias antimicrobianas naturais presentes no alimento. Quanto aos fatores extrínsecos destacam-se (1) a temperatura; (2) a humidade relativa; e (3) a composição do meio, os quais vão ser abordados mais detalhadamente nos tópicos seguintes (Baptista & Venâncio, 2003; Jay et al., 2005c).

### 2.4.1 Fatores intrínsecos

Os fatores intrínsecos podem também ser chamados de fatores inerentes ao alimento, ou seja, são aqueles em que não existe qualquer fator externo que contribua para a multiplicação microbiana (Quali - Segurança Alimentar, 2018). Relativamente a estes, o fator mais importante é a  $A_w$ . A maioria das bactérias patogénicas presentes nos alimentos pode ser controlada, tendo  $A_w$  inferior a 0.85. No entanto, a inibição de toxinas só se dá quando a  $A_w$  é inferior a 0.90, excetuando a *S. aureus* que pode crescer e produzir toxinas em alimentos com  $A_w$  inferior a 0.90 (Baptista & Venâncio, 2003).

#### 2.4.1.1 Atividade da água ( $A_w$ )

A  $A_w$  traduz a interação da água com outros constituintes dos alimentos em condições de equilíbrio termodinâmico. Ou seja, a  $A_w$  traduz-se como o quociente entre a pressão de vapor de água em equilíbrio no alimento e a pressão de vapor da água pura à mesma temperatura (equação 1), variando os seus valores entre 0 e 1. Quanto maior o valor deste fator mais água livre terá o sistema associado (Nielsen et al., 2012).

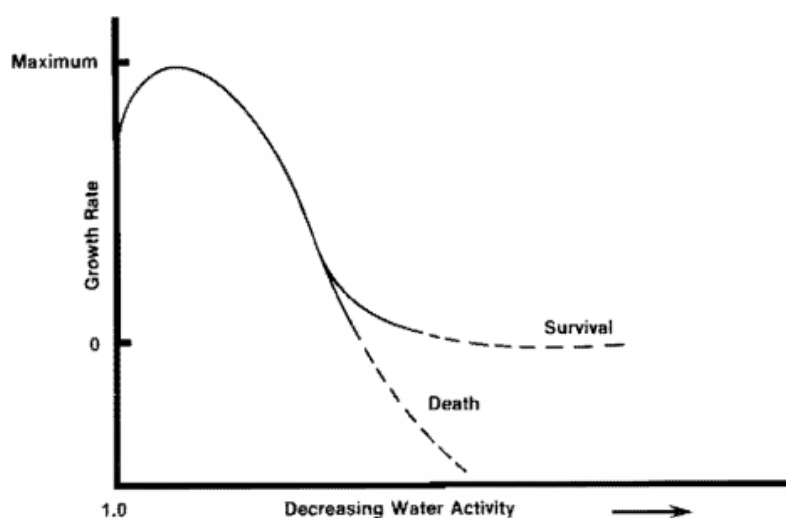
$$A_w = \frac{p}{p_0} \quad (\text{Equação 1})$$



A resposta dos microrganismos à  $A_w$  nos diferentes alimentos pode, ser afetada por um determinado número de fatores, sendo o crescimento microbiano, e em alguns casos a produção dos seus metabolitos, particularmente sensíveis a alterações de  $A_w$  (Baptista & Venâncio, 2003).

A gama ótima de  $A_w$ , para a maior parte dos microrganismos, situa-se entre 0.995-0.980. A diminuição da  $A_w$  (devido à adição de sal, açúcar, secagem ou cura), resulta na inibição do crescimento microbiológico ou num aumento da fase de latência, representada na Figura 2, seguido de um decréscimo da taxa de crescimento, o que leva a um aumento do tempo de prateleira dos alimentos.

No caso das bactérias, representadas na Figura 7, estas requerem elevados valores de  $A_w$  ( $\geq 0.88$ ) para se desenvolverem, por isso em produtos alimentares secos estas não estão presentes com tanta frequência. No caso das leveduras, estas normalmente crescem em condições de  $A_w$  entre 0.87-0.94, excetuando algumas espécies osmotolerantes que são capazes de crescer quando  $A_w$  é igual a 0.60. E, por último, no caso dos bolores, estes podem crescer em alimentos com  $A_w$  mais baixa (0.70-0.80) (Petruzzi et al., 2016).



**Figura 7.** Influência da atividade da água no crescimento bacteriano. Retirado de (Sperber, 1983)

Adicionalmente, é de salientar que os todos os fatores estão interligados para que se atinjam condições ideais à conservação dos alimentos (Rodrigues, 2015). Desta forma, a  $A_w$  pode ser utilizada em combinação com outros fatores de maneira a controlar o desenvolvimento de microrganismos patogénicos nos produtos alimentares, podendo ser manipulada nos alimentos de várias formas, nomeadamente, através (1) da adição de solutos, como o sal e o açúcar; (2) da

remoção da água por processos de secagem ou cozedura; (3) da indisponibilização da água por congelação e; (4) da ligação da água a compostos macromoleculares (Baptista & Venâncio, 2003). No entanto, a  $A_w$  não depende diretamente da temperatura, mas sim da composição do alimento, o que na prática significa que a  $A_w$  depende indiretamente da temperatura uma vez que esta influencia a concentração e/ou dissociação dos constituintes do alimento. Na maioria dos ingredientes alimentares e solventes, um aumento de temperatura traduz-se num aumento da atividade da água, por exemplo, a  $A_w$  de um alimento a baixa temperatura é menor do que a  $A_w$  desse mesmo alimento à temperatura ambiente. Esta regra é quebrada quando estamos perante elevadas concentrações de açúcares ou sais, em que um aumento da temperatura se traduz numa redução da  $A_w$  (Rodrigues, 2015).

Os alimentos com valores de  $A_w > 0.90$  têm uma grande probabilidade de sofrer contaminação microbiológica, uma vez que as soluções diluídas dos alimentos desempenham o papel de substrato para o crescimento de microrganismos; para valores inferiores (0.4-0.8) são favorecidas as reações químicas enzimáticas, uma vez que ocorre um aumento da concentração dos reagentes; abaixo de  $A_w = 0.6$  o crescimento de microrganismos é praticamente inexistente e: quando  $A_w < 0.3$  é atingida a zona de adsorção primária na qual não existe dissolução dos componentes do alimento pela água o que reduz a velocidade das reações exceto a oxidação lipídica.

Genericamente, diminuindo-se a  $A_w$  o alimento é conservado mais eficazmente, traduzindo-se a atividade da água numa forma mais realista da capacidade de conservação de um alimento, determinando muitas vezes o tempo de prateleira de um produto (Rodrigues, 2015).

#### 2.4.1.2 *Acidez*

A acidez, inclusive dos alimentos, normalmente é medida numa escala de pH, o qual é o logaritmo decimal do inverso da concentração de ião de hidrogénio no alimento.

A maioria dos alimentos são naturalmente ácidos, sendo que as frutas geralmente são mais ácidas que os restantes alimentos. Por outro lado, existe um número limitado de alimentos, como a clara de ovo, que é alcalina. Assim, desenvolvem-se diferentes espécies de microrganismos nos alimentos dependendo do seu valor de pH que naturalmente limita a gama de microrganismos que aí podem crescer (Baptista & Venâncio, 2003; Petruzzi et al., 2016).

A maior parte dos microrganismos desenvolvem-se em condições de pH neutro, ou seja, o pH do citoplasma bacteriano. No entanto, existem bactérias capazes de tolerar gamas de pH fora destes intervalos, como por exemplo *Lactobacillus* (3.0 - 4.4) e *Acetobacter* (2.8). No caso das leveduras, estas crescem numa gama de pH entre 4.5 - 7.0, havendo algumas exceções que crescem a valores de pH mais baixos, como é o caso da *Hanseniaspora uvarum*, que cresce a 1.5 (Petruzzi et al., 2016).

É de salientar que a redução do pH num alimento contribui para reduzir a capacidade de desenvolvimento microbiano e, por isso a acidificação de alimentos, quer através de processos fermentativos (ex.: iogurtes), quer através da adição de ácidos fracos (ex.: conservas) é utilizada como técnica de conservação de alimentos. Para além disso, outra característica que se torna relevante nos alimentos quando se utiliza a acidez como mecanismo de controlo do crescimento microbiano, é a capacidade tampão, a qual consiste na capacidade do alimento para manter praticamente inalterado o seu pH, quando neste são gerados compostos ácidos ou alcalinos decorrentes da atividade dos microrganismos aquando o seu crescimento.

Tal como outros fatores intrínsecos, o pH deve ser medido para cada um dos componentes do produto alimentar, bem como nas interfaces entre os diferentes componentes e, também em qualquer potencial microambiente que possa existir no produto (Baptista & Venâncio, 2003).

#### 2.4.1.3 Potencial de oxidação – redução

Relativamente aos processos de oxidação-redução, estes estão relacionados com a permuta de eletrões entre as substâncias químicas. Este potencial pode ser definido como a capacidade que certos substratos têm para ganhar ou perder eletrões, sendo que o elemento que perde o eletrão é denominado de oxidado, e o que ganha, de reduzido. Este parâmetro é medido em milivolts (mV), sendo a sua medição é efetuada quando o pH é igual a 7.

A classificação dos microrganismos e o respetivo potencial de oxidação-redução encontra-se na Tabela 2 (Baptista & Venâncio, 2003).

**Tabela 2.** Classificação dos microrganismos de acordo com o potencial de oxidação-redução. Adaptado de (Baptista & Venâncio, 2003)

Classificação	Potencial de oxidação-redução (mV)
	Ótimo
Aeróbios	+300 a +500
Anaeróbios	- 250 a +100
Aeróbios facultativos	-100 a +300

Do grupo dos microrganismos aeróbios fazem parte quase todos os bolores, leveduras oxidantes e muitas bactérias, principalmente aquelas que deterioram alimentos (ex.: *Pseudomonas*) e algumas bactérias patogênicas aeróbias (*B. cereus*, *Aeromonas hydrophila*). Também existem outras bactérias aeróbias, denominadas microaerófilas, uma vez que crescem melhor em condições reduzidas, exemplo disso são os *Lactobacillus* e os *Streptococcus*.

No caso dos microrganismos anaeróbios existem algumas bactérias patogênicas no seu grupo, nomeadamente *C. botulinum*, o qual é responsável pela deterioração de muitos alimentos. Para além disso, entre os microrganismos aeróbios facultativos estão as bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Baptista & Venâncio, 2003).

#### 2.4.1.4 Composição química – matriz de nutrientes

Tal como qualquer organismo, também os microrganismos necessitam de um conjunto principal de nutrientes favoráveis ao seu crescimento e à realização das suas funções metabólicas básicas. De entre os nutrientes que a maior parte dos microrganismos necessitam destacam-se a (1) água; (2) fonte de energia; (3) azoto; (4) vitaminas e; (5) sais minerais. Todos estes nutrientes encontram-se presentes na generalidade dos alimentos, no entanto as suas quantidades variam de alimento para alimento (Baptista & Venâncio, 2003; Jay et al., 2005c).

Como fontes de energia, os microrganismos patogênicos obtêm energia através de diferentes fontes, tais como açúcares, álcoois e aminoácidos. Para além disso, alguns microrganismos são capazes de utilizar matrizes de hidratos de carbono complexos tais como, amido e celulose degradando-os em açúcares mais simples. As gorduras presentes nos alimentos também são

utilizadas como fontes de energia para os microrganismos, no entanto estes compostos são restritos a um pequeno número de microrganismos.

No que toca às fontes de azoto, as mais utilizadas pelos microrganismos heterotróficos são os aminoácidos (Jay et al., 2005c). No entanto, existem outras tais como, a ureia, a amónia e as metilaminas (Baptista & Venâncio, 2003).

Quanto às vitaminas, normalmente todos os alimentos possuem a quantidade necessária ao crescimento de microrganismos. Para além disso, as bactérias gram-positivas são mais exigentes, necessitando de um ou mais destes compostos antes de crescerem, que as gram-negativas e os bolores, uma vez que podem sintetizar os seus próprios fatores de crescimento, podendo limitar a proliferação microbiana quando se deteta a ausência de algum nutriente. Neste caso, as vitaminas mais importantes para o crescimento de microrganismos são as do complexo B, a biotina e o ácido pantoténico (Baptista & Venâncio, 2003; Jay et al., 2005c).

Por último, os sais minerais apesar de serem utilizados em pequenas quantidades são muito importantes para o crescimento microbiano devido ao seu papel nas reações enzimáticas. Dentro destes destacam-se o sódio, o potássio, o cálcio, o magnésio, o ferro, o manganésio, o fósforo e o enxofre (Baptista & Venâncio, 2003).

#### 2.4.1.5 *Estruturas biológicas*

A estrutura natural de alguns alimentos confere-lhes uma excelente proteção, desfavorável à entrada de microrganismos patogénicos, e subsequente deterioração (Jay et al., 2005c). São exemplo dessas barreiras físicas as cascas dos frutos e dos vegetais, as conchas de nozes, as conchas de animais e as cascas e as membranas dos ovos. A manutenção destas estruturas biológicas intacta é importante, uma vez que previne a entrada de microrganismos e o subsequente desenvolvimento microbiano. Caso estas estruturas não sejam mantidas durante a colheita, o transporte e o armazenamento, muito provavelmente os alimentos vão ser sujeitos a uma penetração por parte dos microrganismos presentes no ambiente facilitando-lhes o acesso aos nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. Na fase posterior à colheita, os microrganismos patogénicos podem sobreviver na superfície exterior dos frutos e vegetais. No entanto, normalmente não existem condições de crescimento para estes se desenvolverem, dado que também não tem capacidade de produzir enzimas necessárias para atacarem as cascas dos

alimentos, cascas essas, que restringem o acesso à água e restantes nutrientes por parte destes microrganismos.

Para além disso, o aquecimento de alimentos, pode provocar a rutura dessas estruturas biológicas que possuem efeito protetor, podendo alterar o pH e a Aw, potenciando assim as condições ideais para favorecer o crescimento microbiano (Baptista & Venâncio, 2003).

#### 2.4.1.6 *Substâncias antimicrobianas*

A estabilidade de alguns alimentos contra o ataque por parte de microrganismos é devida à presença de certas substâncias naturais que possuem atividade antimicrobiana. Algumas espécies de plantas são conhecidas por terem na sua composição óleos essenciais que possuem atividade antimicrobiana (Jay et al., 2005c). Tal como as espécies vegetais, também as de origem animal contêm este tipo de substâncias capazes de inibir o crescimento microbiano, sendo exemplo disso mesmo, o ovo (lisozima) e o leite (lactoferrina).

Adicionalmente, também existem alguns processos de transformação de alimentos que resultam na formação de compostos com características antimicrobianas, destacando-se os processos de deposição de substâncias antimicrobianas na superfície dos produtos, nos processos de fumagem de carnes e pescado e, ainda processos de formação de compostos de Maillard resultantes da reação entre açúcares e formação de bactericidas, antibióticos e outros inibidores, resultantes de processos fermentativos.

Apesar destas substâncias contribuírem positivamente para a inibição do crescimento de microrganismos, normalmente a sua concentração é demasiado baixa, para que por si só possam assegurar a estabilidade do alimento, devendo ser combinado com outros fatores, descritos anteriormente (Baptista & Venâncio, 2003).

#### 2.4.2 Fatores extrínsecos

No que toca aos fatores extrínsecos, estes não são dependentes do substrato. Neste caso, os alimentos e os microrganismos são afetados pelas condições de armazenamento. Destacam-se,

portanto, fatores como a (1) temperatura; (2) humidade relativa e; (3) composição do meio, os quais irão ser abordados nas subseções seguintes (Jay et al., 2005c).

#### 2.4.2.1 *Temperatura*

A temperatura destaca-se, de entre os fatores extrínsecos, como um fator de extrema importância para caracterizar as bactérias. Nesse sentido, existem 4 gamas de temperatura que permitem distinguir as bactérias (Tabela 3).

**Tabela 3.** Gama de temperaturas característica dos diferentes microrganismos. Retirado de (Baptista & Venâncio, 2003)

Grupo	Temperatura (°C)		
	Mínimo	Ótimo	Máximo
<b>Termófilos</b>	40 a 45	55 a 75	60 a 90
<b>Mesófilos</b>	5 a 15	30 a 45	35 a 47
<b>Psicrófilos</b>	-5 a +5	12 a 15	15 a 20
<b>Psicotróficos</b>	-5 a +5	25 a 30	30 a 35

Os microrganismos patogénicos normalmente encontram-se no grupo dos mesófilos, crescendo com uma temperatura ótima de desenvolvimento entre os 30 e os 45 °C. No entanto, o crescimento microbiano é também afetado por outros fatores intrínsecos e extrínsecos associados à temperatura, como por exemplo o tempo de exposição dos alimentos aos microrganismos (Baptista & Venâncio, 2003).

#### 2.4.2.2 *Humidade relativa*

A humidade relativa afeta diretamente os fatores intrínsecos, nomeadamente a  $A_w$  do alimento discutida no ponto 2.4.1.1. Por exemplo, se um alimento com baixa  $A_w$  está armazenado num ambiente com elevada humidade, a sua  $A_w$  aumenta, permitindo a multiplicação de microrganismos. Assim, a combinação entre a  $A_w$  e a humidade relativa tem um impacto significativo não podendo ser desprezada (Baptista & Venâncio, 2003).

#### 2.4.2.3 *Composição do meio*

Relativamente à composição do meio existem alguns compostos que são diretamente tóxicos para alguns microrganismos, nomeadamente gases como o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), o ozono (O<sub>3</sub>) e o oxigénio (O<sub>2</sub>). O mecanismo de inibição depende das propriedades físico-químicas de cada um dos gases e da sua interação com a fase líquida e lipídica do alimento. A oxidação gerada pelo ozono e pelo oxigénio é altamente tóxica para as bactérias anaeróbias e, dependendo da sua concentração pode ter um efeito inibidor nos aeróbios. Por outro lado, o dióxido de carbono é eficaz relativamente aos microrganismos aeróbios, podendo em concentrações elevadas inibir o crescimento de outros microrganismos.

Adicionalmente, várias tecnologias são utilizadas e combinadas com a temperatura para aumentar a inibição do crescimento microbiano, destacando-se (1) embalagem em atmosfera modificada; (2) embalagem em atmosfera controlada e; (3) embalagem em atmosfera controlada (Baptista & Venâncio, 2003).

### 2.5 **Processamento térmico**

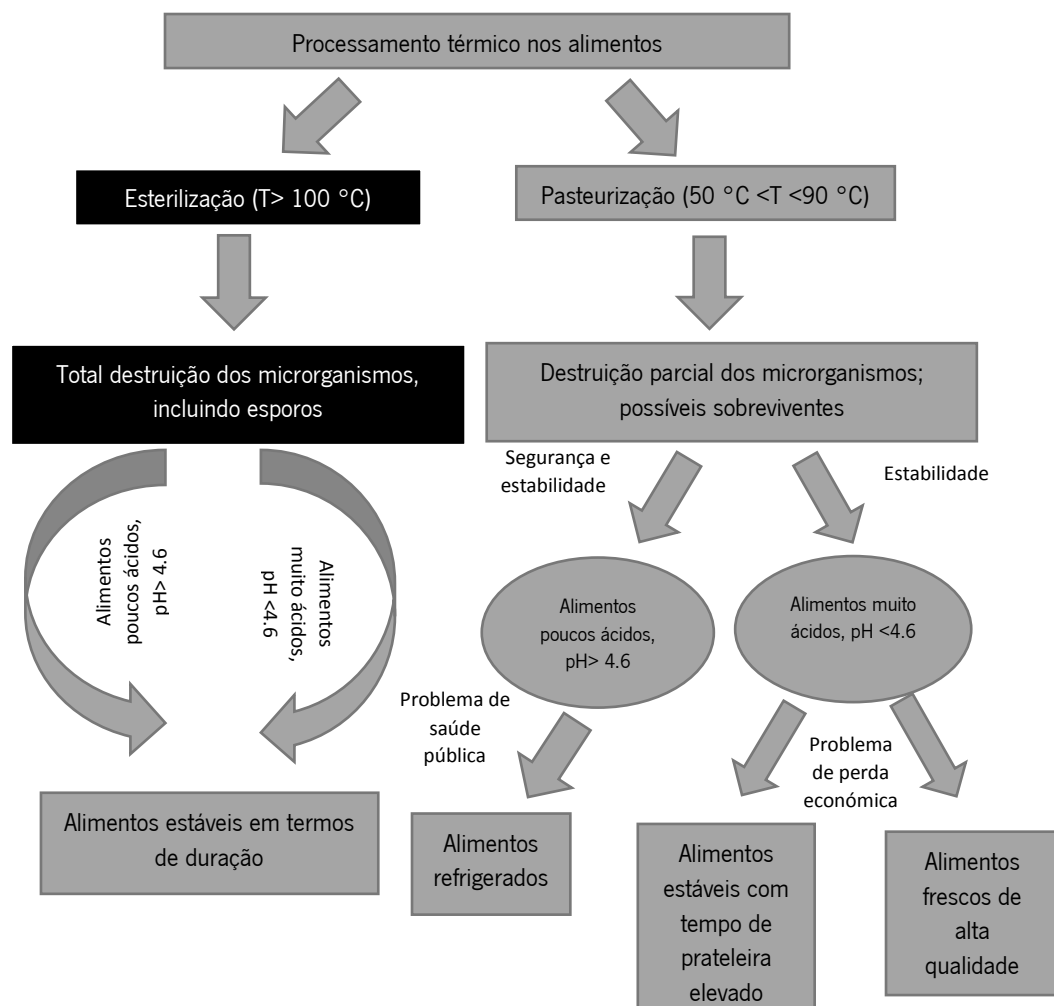
Os tratamentos térmicos são bastante utilizados no processamento alimentar, principalmente a pasteurização e a esterilização, os quais têm efeitos desejáveis sobre algumas propriedades dos alimentos (ex.: sabor) e tem efeito sobre a conservação dos mesmos destruindo enzimas e microrganismos indesejáveis (Rodrigues, 2016). Desta forma, o principal objetivo do processamento térmico em produtos alimentares, que envolve aquecimento e refrigeração, passa por produzir alimentos com tempo de prateleira estável, livres de microrganismos patogénicos e, consequentemente seguros. O primeiro passo tem como intuito, destruir os microrganismos capazes de crescer no produto, bem como prevenir futuras contaminações aquando o seu embalamento (Simpson, 2009c).

Como em qualquer processo existem sempre vantagens e inconvenientes associados ao mesmo, e o processamento térmico não é exceção. Nesse sentido, este processamento tem como vantagens facilitar o controlo das condições de operação, capacidade para produzir alimentos com tempo de prateleira prolongado e, por vezes sem necessidade de refrigeração, assim como a possibilidade de destruir alguns compostos anti-nutricionais e a possibilidade de melhorar a biodisponibilidade de alguns nutrientes. No entanto, o calor resultante destes tratamentos também



pode alterar/destruir alguns componentes dos alimentos responsáveis pelas suas propriedades organoléticas (aroma, cor, sabor ou textura). Adicionalmente, o processamento térmico está associado a um gasto de energia muito elevado, ou seja, custos de produção também muito elevados. Portanto, a otimização dos tratamentos térmicos é fundamental não só para minimizar os consumos de energia, mas também para minimizar a deterioração alimentar com a maximização da segurança alimentar baseada na eliminação dos microrganismos indesejáveis (Cheon et al., 2015).

Generalizando, os processamentos térmicos que usam temperaturas mais elevadas durante menos tempo permitem uma melhor retenção das características sensoriais e nutricionais nos alimentos (Rodrigues, 2016; Simpson, 2009b).



**Figura 8.** Esquema ilustrativo dos tratamentos térmicos - Esterilização e Pasteurização. Adaptado de (Simpson, 2009b)

### 2.5.1 Esterilização

A esterilização consiste num processo térmico, em que se usam temperaturas elevadas para destruir a atividade microbiana e enzimática dos alimentos. Este processo normalmente é aplicado em produtos enlatados, a uma temperatura elevada durante longos períodos de tempo, o que por vezes pode resultar na alteração substancial das características sensoriais e nutricionais dos alimentos. Contudo, novos desenvolvimentos optam por tempos de processamento mais curtos ou pelo processamento pré-embalagem (tratamento assético) para colmatar a falhas referidas anteriormente relativamente às propriedades organoléticas dos produtos (Rodrigues, 2016).

Um dos fatores mais importantes na decisão da severidade do processo é o pH do produto, o qual pode variar entre neutro (pH=7) e ácido (pH=2.8). O *C. botulinum* é o organismo que mais frequentemente contamina os alimentos, tal como outras bactérias formadores ou não formadoras de esporos, o seu crescimento pode ser inibido a um pH de 4.5.

A maior parte dos produtos alimentares necessita de uma esterilização (ex.: carne, peixe e vegetais). No entanto, existem alguns produtos, nomeadamente produtos ácidos com pH 3.7 - 4.5 (ex.: tomate e pera) que necessitam de outro tipo de processamento (pasteurização) dependendo da sua variedade e maturidade. Para estes produtos são necessários vários testes para identificar os organismos patogénicos que são fundamentais eliminar e, para além disso é também crucial perceber quais são os efeitos inibitórios dos ingredientes em preparados de produtos.

Outro fator que é crucial ter em conta, passa por saber qual a carga microbiana inicial do produto, podendo esta ser controlada nos processos de preparação e tomando as precauções essenciais a nível de higiene (Simpson, 2009c).

### 2.5.2 Pasteurização

A palavra “pasteurização” teve a sua origem nos trabalhos que o francês Louis Pasteur desenvolveu, e refere-se a um tratamento térmico leve (50 – 90 °C) utilizado para a conservação alimentar com o intuito de inativar microrganismos patogénicos e vegetativos responsáveis pela deterioração dos alimentos. Ao contrário da esterilização, depois da pasteurização, os alimentos não se encontram estéreis uma vez que os microrganismos termorresistentes continuam presentes. Portanto, outras formas de preservação, como por exemplo, a refrigeração (no leite), a atmosfera modificada (embalamento a vácuo), a adição de conservantes antimicrobianos (sal,

ácido cítrico, ácido benzoico...) ou combinações destes são fundamentais para a estabilização e distribuição do produto.

Exceções a esta regra são alguns alimentos processados que contêm constituintes ou ingredientes que são antimicrobianos quando sujeitos a certas condições que não permitem o crescimento microbiano, como por exemplo, alimentos fermentados com álcool ou ácidos (vinho, cerveja, pickles), bebidas carbonatadas (sodas/refrigerantes), alimentos muito doces com  $A_w < 0.65$  ou sólidos solúveis com  $^{\circ}\text{Brix}=70$  (mel, compotas, gelatinas, frutos secos, frutos concentrados), ou alimentos salgados (peixe ou carne salgados) (Simpson, 2009b).

A pasteurização tem diferentes finalidades para diferentes valores de pH, ou seja, em alimentos pouco ácidos ( $\text{pH} > 4.5$ ) este processamento é utilizado para diminuir a carga microbiana e aumentar o tempo de prateleira por alguns dias; enquanto que em alimentos ácidos, este é utilizado para aumentar o tempo de prateleira por alguns meses, pela destruição de microrganismos e enzimas. Em ambos os casos, ocorrem alterações suaves das características sensoriais e nutricionais (Rodrigues, 2016).

### 2.5.3 Fatores que afetam a termorresistência de *Bacillus cereus*

O mesmo número de bactérias incorporadas em meios nutritivos com o mesmo pH não é destruído com a mesma facilidade quando exposto a altas temperaturas. Dependendo das condições dos fatores intrínsecos detalhados anteriormente, o comportamento dos microrganismos quando sujeitos ao calor difere, uma vez que nem todos têm as mesmas condições de *stress* associadas. No caso particular da bactéria formadora de esporos, *B. cereus*, são apresentados de seguida alguns resultados obtidos por Gaillard e seus colaboradores e, resumidos por Jay, quando a mesma foi exposta a diferentes condições de  $A_w$ , pH e temperatura.

Desta forma afirmaram que a termorresistência das células microbianas aumenta com o decréscimo da humidade, ou  $A_w$ , representado para os esporos de *B. cereus* na Tabela 4. Por exemplo, para  $A_w=1$  e  $\text{pH}=6.5$ , o  $D_{95^{\circ}\text{C}}=2.4$  min, enquanto para  $A_w=0.86$ , obteve-se  $D_{95^{\circ}\text{C}}=13.8$  min (Jay et al., 2005a).

**Tabela 4.** Valor de  $D_r$  para diferentes condições de T, pH e  $A_w$  dos esporos de *Bacillus cereus*. Retirado de (Gaillard et al., 1998; Jay et al., 2005a).

Temperatura (°C)	$A_w$	$D_r$ (minutos)		
		pH=6.5	pH=5.5	pH=4.5
95	1.00	2.4	1.0	0.5
95	0.95	5.0	2.5	1.4
95	0.86	13.8	14.5	7.8
85	1.00	63.4	13.1	5.0
85	0.86	68.9	91.5	33.9

Os resultados observados na Tabela 4 podem ser justificados pelo facto das células em ambiente desidratado colocadas em tubos e de seguida submetidas a um banho térmico serem muito mais resistentes ao calor do que as células em ambiente hidratado da mesma espécie. Uma vez que está bem estabelecido que a desnaturação proteica ocorre mais rapidamente quando as células são aquecidas na presença de água, sugere-se que este mecanismo de desnaturação esteja diretamente relacionado com a morte térmica. No entanto, o modo como a água facilita a desnaturação de proteínas pela ação do calor não é muito claro, sabendo-se porém que o aquecimento de proteínas hidratadas leva à formação de grupos -SH livres e, conseqüentemente a um aumento da capacidade de ligação da água às proteínas. Para além disso, a presença de água permite a quebra térmica das ligações peptídicas, processo esse que na ausência de água requer mais energia e, conseqüentemente confere melhor refratividade ao calor (Jay et al., 2005a).

Para além disso, as células bacterianas tendem a ser mais resistentes ao calor durante a fase estacionária e menos resistentes durante a fase logarítmica da curva de crescimento, representada na Figura 2 do subcapítulo 2.3, e *B. cereus* não é exceção. Adicionalmente, a resistência térmica dos microrganismos também é elevada no início da fase de latência, no entanto sofre um decréscimo até ao mínimo, assim que as células entram na fase logarítmica. É de salientar que, os esporos bacterianos mais velhos são conhecidos por serem mais resistentes que os mais novos (Jay et al., 2005a).

## 2.5.4 Parâmetros associados à pasteurização

O calor é letal para os microrganismos, no entanto cada espécie tem a sua própria tolerância a este fenómeno. Durante o processo de destruição térmica, como a pasteurização, a taxa de destruição é logarítmica assim como a taxa de crescimento de microrganismos. Portanto, as bactérias são mortas com uma taxa proporcional ao número de organismos presentes. (Goff, 2015)

### 2.5.4.1 *D-value, D<sub>T</sub>*

O *D-value*, representado na Figura 9, corresponde à fórmula matemática mais utilizada para quantificar a taxa de morte dos microrganismos, medindo a resistência térmica de um microrganismo. É definido como, o tempo necessário, a uma dada temperatura para reduzir um ciclo logarítmico de microrganismos (90% da população), o qual está representado na equação 2 (Frąc et al., 2015; Goff, 2014, 2015; Rodrigues, 2016). À medida que a temperatura de pasteurização aumenta, o valor de  $D_T$  tende a diminuir. Este é um processo exponencial utilizado ao longo de todo o processamento térmico, em que utilizando o  $\log D_T$  em função da temperatura nos é dado o valor de  $z$ , representado na Figura 10 (Adams & Moss, 2008).

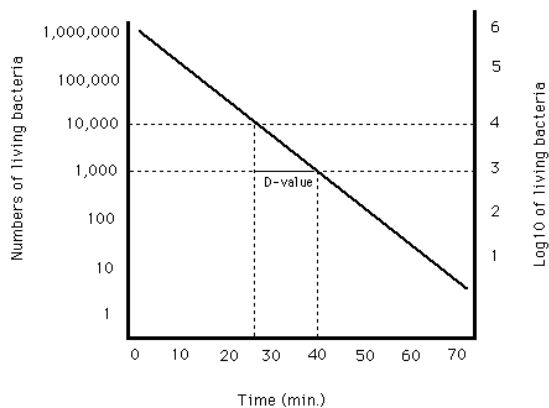
$$D = \frac{t}{\log N_0 - \log N_t} \quad (\text{Equação 2})$$

Se o número de microrganismos nos alimentos aumentar, o tempo de aquecimento necessário do processo também irá aumentar para que haja uma diminuição da população de microrganismos até um nível aceitável. Normalmente, a pasteurização é baseada no conceito  $12 D$ , de modo a que haja a redução de 12 ciclos logarítmicos no número de microrganismos presentes (Goff, 2015). Desta forma, é praticamente garantido que os microrganismos patogénicos foram eliminados, uma vez que estes são os ciclos necessários para eliminar a espécie *C. botulinum*.

De maneira a obter os binómios temperatura/tempo de pasteurização adequados à eliminação dos microrganismos é utilizada a equação 3 (Gibbs & Silva, 2012), tendo em conta os valores de referência do género em questão, assim como os valores dos parâmetros cinéticos obtidos, resultantes do estudo microbiano efetuado.

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

Tal como está representado na Figura 9, um *D-value* a 72 °C durante 1 minuto significa que por cada minuto do processo a 72 °C, a população bacteriana do microrganismo alvo será reduzida em 90%. Neste caso, significa que o  $D_{72^{\circ}\text{C}}$  é de 14 minutos (Goff, 2015).



**Figura 9.** *D-value* em função do tempo, em minutos, bem como do número de bactérias presentes no alimento. Retirado de (Goff, 2015).

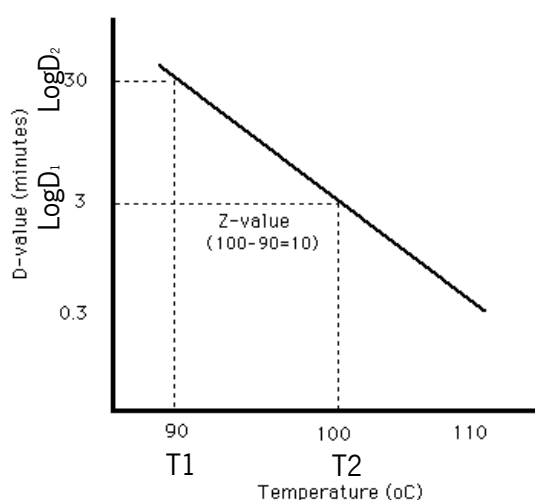
No caso dos ascósporos dos fungos termorresistentes como os géneros, *Neosastorya*, *Byssochlamys* e *Talaromyces*, os mesmos podem sobreviver a temperaturas entre 55 °C e 95 °C, e em alguns deles já foi possível observar uma redução decimal entre os minutos 1.5 - 11 a 90 °C. Fungos termorresistentes isolados de diferentes ambientes, tem diferentes  $D_T$  em condições distintas de pH e  $A_w$ . Nesse sentido, alguns autores avaliaram a resistência térmica de alguns ascósporos em alguns produtos frutícolas, como por exemplo a *Talaromyces flavus* e a *Neosastorya fischeri* e, constataram que a segunda é mais resistente ao calor que a primeira e que a espécie *Byssochlamys nivea* é menos resistente de todas (Frąc et al., 2015).

Relativamente às bactérias formadoras de esporos, uma das que mais se destaca no processamento de produtos à base de fruta é a *Alicyclobacillus acidoterrestris*, a qual tem um *D-value* com uma associação não linear à temperatura, e uma associação linear com o pH e conteúdo de sólidos solúveis, ou seja teoricamente, o *D-value* é afetado, com mais frequência, pelas variações que ocorrem a nível da acidez e do conteúdo de sólidos solúveis do que quando sujeito a variações de temperatura. Contrariamente a esta constatação, esta espécie parece ser minimamente afetada pela variação do pH. Estas variações parecem ter maior impacto quando esta é sujeita a temperaturas mais baixas (85 – 97 °C), mostrando ligeiras subidas no *D-value*, assim como no conteúdo de sólidos solúveis e pH. Para além disso, na presença de ácidos orgânicos (pH entre 2.8 e 4.0 e temperaturas entre 91 – 97 °C) não existem efeitos significativos

na resistência térmica desta bactéria. No entanto, esta é mais notada a temperaturas abaixo de 91 °C (Steyn et al., 2011).

#### 2.5.4.2 *z-value, z*

Para além do *D-value* existem outros parâmetros que permitem avaliar a resistência térmica dos produtos, nomeadamente, o *z-value* que diz respeito ao intervalo de temperatura necessário para alterar o *D-value* em um ciclo logarítmico, o qual corresponde ao declive negativo da curva, representada na Figura 10 (Rodrigues, 2016).



**Figura 10.** *z-value* em função da temperatura e do *D-value*. Adaptado de (Goff, 2015)

A partir da equação 4 é possível calcular o valor de *z* para os microrganismos pretendidos (Goff, 2014) .

$$z = \frac{T2 - T1}{\log D_1 - \log D_2} \quad (\text{Equação 4})$$

## 2.6 Microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva pode ser considerada como sendo a ferramenta de investigação relacionada com a carga microbiana presente nos alimentos. De uma forma geral, os vírus e protozoários apresentam-se como inertes nos alimentos. E, por isso este conceito, inicialmente, focava-se exclusivamente no crescimento e eliminação de bactérias e fungos nos produtos

alimentares. No entanto, atualmente, os modelos de inativação de vírus e protozoários também começaram a ser realizados.

O conceito de “microbiologia preditiva” surgiu em 1937, no entanto só foi sugerido nos anos 80, uma vez que nessa altura já havia acesso a ferramentas computadorizadas e a urgência de tratar intoxicações alimentares era uma prioridade desde sempre. O conceito foi então proposto com o intuito de estudar sistematicamente o crescimento de microrganismos, bem como quantificá-lo e modelá-lo matematicamente respeitando os fatores principais (temperatura, pH e  $A_w$ ) que afetam o crescimento microbiano na maioria dos alimentos (Ross et al., 2014).

Deste modo, a microbiologia preditiva tem vindo a registar um rápido crescimento implicando o uso de modelos/equações matemáticas para prever o crescimento e/ou atividade de um microrganismo num produto. O conceito não é novo, uma vez que este já é aplicado em cálculos de processos térmicos de alimentos pouco ácidos enlatados. A novidade passa sim pelo interesse em alargar o conceito a uma grande variedade de microrganismos patogénicos alimentares, utilizando modelos matemáticos/computorizados sofisticados para avaliar os diferentes parâmetros de crescimento (Jay et al., 2005b). No que toca as vantagens, este conceito acarreta algumas em diferentes campos da segurança alimentar, tais como (1) previsão das consequências ao nível do tempo de prateleira e da segurança alimentar do produto, quando sujeito a alterações na formulação; (2) avaliação objetiva das operações do processamento, levando a um melhoramento da análise de perigos e pontos críticos de controlo (HACCP) e; (3) avaliação objetiva das consequências das falhas no controlo do processo e armazenamento (Ross et al., 2014).

Descoberto este conceito, pensou-se que a necessidade de fazer análises microbiológicas se reduziria consideravelmente, bem como se tornaria uma forma mais rápida e menos dispendiosa de obter informações sobre o comportamento dos microrganismos. No entanto, apesar deste conceito ter sido aceite em algumas aplicações na indústria, outras vêem-no com algum ceticismo afirmando que existem muitas variáveis associadas à estrutura dos alimentos e fisiologia microbiana para permitir que sejam feitas previsões fiáveis, e por isso as análises laboratoriais acabaram por não ser excluídas. Nesse sentido, os modelos devem ser utilizados com muita precaução e usados por profissionais experientes com consciência das suas limitações, nomeadamente ao nível (1) da análise das condições iniciais; (2) de relevância do modelo em alimentos; (3) da variabilidade de resposta; (4) do princípio de utilização simples e; (5) da natureza empírica do modelo (Food Safety Authority of Ireland, 2015; Ross et al., 2014).

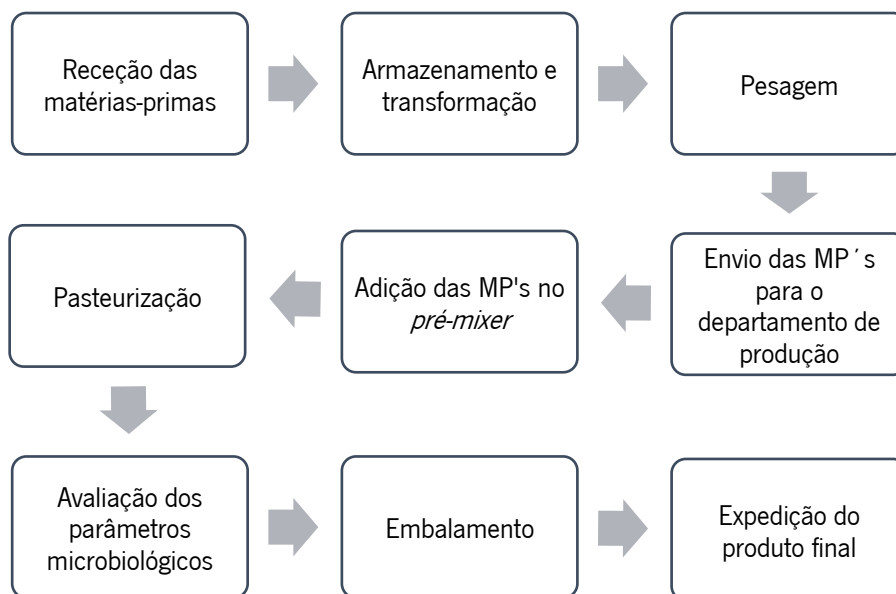


## 2.7 Preparados de cereais Frulact

### 2.7.1 Processamento Industrial

Como em qualquer processo industrial, também o processamento de preparados de cereais é sujeito a etapas de transformação química, física e /ou biológica das matérias-primas. Estas transformações têm como objetivo principal a confecção de produtos alimentares para consumo humano e, por isso tem de ser tidos em conta todos os regulamentos e normas em vigor para que todos os produtos estejam dentro dos limites aceitáveis legais.

No que toca às matérias-primas dos preparados de cereais, destacam-se o farelo de trigo, a farinha de aveia e a farinha de cevada, as quais são sujeitas ao processamento demonstrado na Figura 11, para posterior incorporação no produto final.



**Figura 11.** Esquema representativo da transformação das matérias-primas dos preparados de cereais desde a sua receção até à expedição do produto final.

#### 2.7.1.1 Receção das matérias-primas, armazenamento e transformação

Aquando da chegada das matérias-primas à fábrica, as mesmas são codificadas de acordo com o lote a que pertencem e só desta forma é garantida a uma correta gestão de *stocks* rastreabilidade dos mesmos. Posteriormente, todas as matérias-primas são armazenadas nos

respetivos locais, consoante as suas necessidades, sendo que no caso dos cereais, estes são armazenados na refrigeração, enquanto outras matérias-primas, como por exemplo, o amido, é armazenado no armazém de matérias-primas secas.

É de notar que algumas matérias-primas antes de serem armazenadas tem de ser submetidas a processos físicos, nomeadamente corte e moagem, uma vez que só assim estão prontas para serem utilizadas.

#### 2.7.1.2 *Pesagem, ingredientação, pasteurização e embalamento*

Na etapa de pesagem medem-se as quantidades necessárias a adicionar ao *pré-mixer*, de modo a que as formulações sejam corretamente cumpridas.

Na etapa de ingredientação, dá-se a adição sequencial de todos os ingredientes da formulação ao *pré-mixer*, sob agitação, cumprindo o binómio temperatura/tempo estipulado. Posteriormente, quando é atingida a temperatura de pasteurização, esta é controlada durante o tempo de *holding* para que também o binómio temperatura/tempo de pasteurização seja cumprido.

De forma a verificar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos preparados, nomeadamente consistência, pH, Aw e °Brix, estes são medidos antes e depois da pasteurização. A determinação destes parâmetros permite avaliar se ocorreram transformações significativas após o aquecimento do preparado.

Por último, o preparado é embalado (normalmente em condições estéreis), e de seguida expedido até ao consumidor final.

#### 2.7.2 *Composição e valor nutricional dos preparados de cereais*

Atualmente, cada cidadão, consome 133 kg de cereais por ano nos países desenvolvidos e 66 kg nos países em desenvolvimento. Estes fornecem uma grande variedade de macro e micronutrientes, tendo sido associados a um decréscimo do risco de desenvolvimento de doenças crónicas (McKevith, 2004). Para além disso, os cereais, juntamente com as sementes oleaginosas e os legumes, fornecem a maior parte das proteínas, energia, vitaminas e minerais necessários à dieta da maioria das populações. Alguns dos componentes dos cereais que lhes conferem

qualidade, nomeadamente trigo, cevada e aveia, estão sumarizados na Tabela 5. Comparativamente aos legumes e às sementes, os cereais têm baixo teor proteico, no entanto relativamente a outros nutrientes são bastante ricos, como é o caso das vitaminas do grupo B e minerais (FAO, 1999b).

**Tabela 5.** Composição nutricional do trigo, cevada e aveia. Adaptado de (FAO, 1999b).

<b>Fatores</b>	<b>Trigo</b>	<b>Cevada</b>	<b>Aveia</b>
Valor energético (kJ/100 g)	1570	1630	1640
<b>Vitaminas (mg/100 g)</b>			
Tiamina	0.45	0.10	0.60
Riboflavina	0.10	0.04	0.14
Niacina	3.7	2.7	1.3
<b>Aminoácidos (g/16 g N)</b>			
Lisina	2.3	3.2	4.0
Treonina	2.8	2.9	3.6
Metionina e cisteína	3.6	3.9	4.8
Triptofano	1.0	1.7	0.9
<b>Qualidade proteica (%)</b>			
Digestibilidade verdadeira	96.0	88.0	84.1
Valor biológico	55.0	70.0	70.4
Proteína utilizada	5.6	6.8	5.5

Relativamente à sua composição ao nível da percentagem de água, hidratos de carbono, proteínas e lípidos, pode dizer-se que cerca de 12 – 14 % dos cereais são compostos por água, 65 – 75 % de hidratos de carbono, 2 – 6 % de lípidos e 7 – 12 % de proteína. Genericamente, os cereais têm composições praticamente idênticas, apresentando baixos níveis proteicos e elevados níveis de hidratos de carbono. Na Tabela 6, encontram-se resumidos os valores aproximados da composição do trigo, cevada e aveia em termos de proteínas totais, gorduras totais, cinzas, fibras totais e hidratos de carbono (FAO, 1999).

**Tabela 6.** Composição, em percentagem, aproximada dos cereais. Adaptado de (FAO, 1999a; Organic Facts, 2018)

Cereal	Proteínas totais (%)	Gorduras totais (%)	Cinzas (%)	Fibras totais (%)	Hidratos de carbono (%)
Trigo	10.6	1.9	1.4	1.0	69.7
Cevada	11.0	3.4	1.9	3.7	55.8
Aveia	9.3	5.9	2.3	2.3	62.9

Apesar dos cereais apresentarem valores nutricionais favoráveis a uma dieta equilibrada, o seu consumo excessivo pode trazer algumas desvantagens. A maioria dos cereais atualmente comercializados possuem uma quantidade abundante de sal, açúcar e gorduras, os quais devem ser naturalmente evitados. É de salientar que os produtos cujo conteúdo possua grandes quantidades de farelo causam desconforto abdominal, o que pode levar a uma significativa diminuição de absorção de ferro, zinco e outros minerais pelo corpo humano (Organic Facts, 2018).

## 2.8 Histórico de ensaios desenvolvidos na Frulact

Em anos anteriores, foram desenvolvidos na Frulact alguns projetos em que se avaliou a termorresistência de vários microrganismos em diferentes matérias-primas, tendo o *B. cereus* sido considerando o mais crítico. Deste modo, o presente projeto tem como principal objetivo validar os resultados obtidos anteriormente, por forma a permitir à empresa implementar os binómios temperatura/tempo mais adequados à eliminação deste microrganismo termorresistente.

Nesse sentido, serão tidos como ponto de partida os resultados obtidos para este microrganismo, em projetos anteriores, os quais se encontram resumidos na Tabela 7.

Os binómios de temperatura/tempo assinalados a negrito demonstraram ser aqueles em que se verificou uma maior resistência térmica por parte do microrganismo-alvo, pelo que serão os binómios de ingredientação a usar no presente trabalho (30 °C/3 h e 50 °C/3 h) em quatro preparados de cereais distintos.

**Tabela 7.** Resultados obtidos em trabalhos anteriores para *Bacillus cereus*. Adaptado de (Sousa, 2017).

Parâmetros avaliados	Valores dos parâmetros avaliados		Resultados obtidos (valores de D <sub>T</sub> (min) e z (°C))							
	Preparado 1	Preparado 2	Preparado 1				Preparado 2			
Dois preparados de cereais com valores distintos de pH e A <sub>w</sub> .	pH=3.9±0.2; A <sub>w</sub> =0.971	pH=4.0±0.2; A <sub>w</sub> =0.983	85 °C	90 °C	95 °C	z	85 °C	90 °C	95 °C	z
Diferentes binómios temperatura/tempo	40 °C;2 h;	<b>30 °C;3 h;</b>	11.88	3.70	1.83	12.32	5.30	4.55	3.93	<b>76.92</b>
	50 °C;2 h;	40 °C;2 h;	7.29	1.63	-	-	6.75	5.07	3.36	33.00
	<b>50 °C;4 h;</b>	50 °C;2 h;	4.98	5.55	3.11	<b>48.78</b>	6.62	5.62	3.61	38.02
	60 °C;2 h	<b>50 °C;4 h</b>	6.89	5.31	1.14	12.82	6.18	4.46	3.56	<b>41.84</b>



## Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Relativamente ao trabalho laboratorial realizado nas instalações do departamento de inovação da Frulact, preparou-se o material necessário à realização das análises microbiológicas. O material preparado teve em conta o facto de se terem realizado três ensaios em quatro preparados de cereais com diferentes características, nomeadamente pH, Aw e °Brix.

### 3.1 Preparação dos meios de cultura

De forma a preparar, previamente, os meios de cultura e de enriquecimento necessários à realização das análises microbiológicas dos preparados de cereais, prepararam-se tubos de ensaio contendo 9 mL de *Buffered Peptone Water* (BPW) (Merck, Germany) com o objetivo de realizar as diluições sucessivas, de modo a quantificar as UFC/g. Para além disso, foram preparados dois frascos de *Schott* com capacidade de 500 mL, com o mesmo meio de enriquecimento (BPW), de modo a efetuar a ressuspensão de *B. cereus* três dias antes das análises (Subcommittee SC 9, 2013), para que este crescesse e, posteriormente fosse utilizado como inóculo na fase de ingredientação. Adicionalmente, prepararam-se frascos de *Schott* de 100 mL com 90 mL de *Buffered Peptone Water* (BPW) que foram utilizados na suspensão de amostras.

Relativamente aos meios de cultura, apenas se utilizou *Plate Count Agar* (PCA) (VWR Chemicals, Belgium) tendo sido preparado de acordo com as instruções do fornecedor em frascos de *Schott* de 500 mL. Este meio utilizou-se na preparação de placas de Petri destinadas à repicagem de *B. cereus* e, principalmente na realização das análises microbiológicas pelo método de incorporação. É de salientar que todos os frascos se perfizeram com água destilada até ao volume de 500 mL.

Por fim, todo o material foi sujeito a uma esterilização numa autoclave (Panasonic MLS-3781L), aplicando um binómio de temperatura/tempo de 121 °C durante 15 minutos.

### 3.2 Procedimento experimental

O procedimento experimental relativo ao trabalho desenvolvido inclui 4 fases, nomeadamente (1) elaboração dos preparados de cereais, (2) preparação do inóculo, (3) ingredientação e, (4) pasteurização, os quais vão ser descritos detalhadamente nos pontos seguintes.

#### 3.2.1 Elaboração dos preparados de cereais

As análises microbiológicas foram efetuadas em quatro preparados de cereais com as características apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Características intrínsecas inerentes aos diferentes preparados de cereais

Características intrínsecas			
Preparado	pH	Aw	°Brix
1	5.5 ± 0.2	>0.95	12 ± 2
2	4.0 ± 0.2	>0.95	12 ± 2
3	5.5 ± 0.2	≥0.90	58 ± 2
4	4.0 ± 0.2	≥0.90	58 ± 2

Todos os preparados foram realizados numa marmita estéril segundo as formulações fornecidas pela Frulact, respeitando o binómio temperatura/tempo de pasteurização de 110 °C durante 10 minutos e, de seguida foram embalados a 80 °C seguindo os parâmetros normais de embalamento estéril, utilizando-se um maçarico bem como embalagens estéreis para garantir estas condições. De seguida, todos os preparados foram armazenados num equipamento de refrigeração a 5 ± 2 °C para evitar pós-contaminações, as quais poderiam comprometer os resultados das análises efetuadas posteriormente.



### 3.2.2 Preparação do inóculo

Nesta fase foram repicadas colónias de *B. cereus*, a partir de uma placa mãe previamente inoculada com esta bactéria, para placas Petri com PCA. Estas foram incubadas na estufa a 30 °C durante cerca de 72 h. Decorrido este tempo de incubação ressuspenderam-se as colónias em frascos contendo 500 mL de BPW que foram novamente incubados nas mesmas condições.

Passadas as 72 h, a suspensão de cada frasco foi transferida para tubos de *Falcon*, perfazendo, cada um deles, com 40 mL de suspensão. De seguida, procedeu-se à centrifugação destas suspensões (*Rotofix 32A*) a 4000 rpm durante 10 minutos com vista a obtenção do *pellet* e descarte do sobrenadante. Posteriormente, o *pellet*, juntamente com uma quantidade residual de BPW, foi ressuspenso com o auxílio do *vórtex*, de modo a se obter uma suspensão de células concentradas que passou a ser o inóculo para as etapas posteriores. Este inóculo foi armazenado num frigorífico a 5 °C.

### 3.2.3 Ingredientação

Nesta fase, pesaram-se 198 g (99%) de preparado para um frasco de *Schott* de 250 mL e juntaram-se 2 mL (1%) de inóculo previamente preparado. Nesta fase, aplicaram-se dois binómios temperatura/tempo de ingredientação distintos, nomeadamente 30 °C/3 h e 50 °C/3 h. Os mesmos foram preparados recorrendo a um banho térmico. Após o tempo do ensaio, foram imediatamente pesados 10 g do preparado ingredientado para um frasco contendo 90 mL de BPW, sendo esta a primeira diluição a ser considerada aquando a análise do preparado. É de salientar, que este passou a ser o inóculo a ser utilizado na fase posterior à ingredientação, ou seja a fase descrita no subcapítulo 3.2.4.

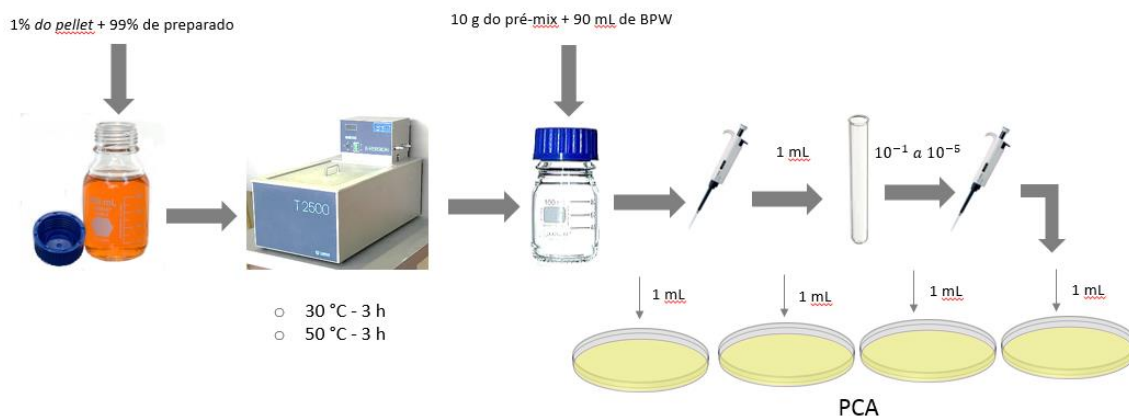


Figura 12. Esquema representativo da fase de ingredientação dos preparados de cereais.

### 3.2.4 Pasteurização

A fase esquematizada na Figura 13 corresponde à fase em que se determinam os parâmetros de morte térmica de *B. cereus*. Pesou-se 76 g (95 %) do respectivo preparado juntamente com 4 g (5 %) do inóculo resultante da fase de ingredientação para cinco frascos estéreis (ver na Figura 13 – frascos de tampa vermelha).

De seguida, todos os frascos foram submetidos a três tratamentos térmicos a diferentes temperaturas – 80 °C, 85 °C e 90 °C – durante 10 minutos. Ao longo deste tempo, foi-se retirando frascos correspondentes aos tempos t0, t3, t5, t7 e t10 e pesou-se 10 g de cada um para frascos contendo 90 mL de BPW. Daqui obtiveram-se 5 amostras que foram posteriormente avaliadas relativamente ao seu conteúdo microbiológico permitindo dessa forma a determinação dos parâmetros de morte térmica do *B. cereus* em diferentes condições de processamento.

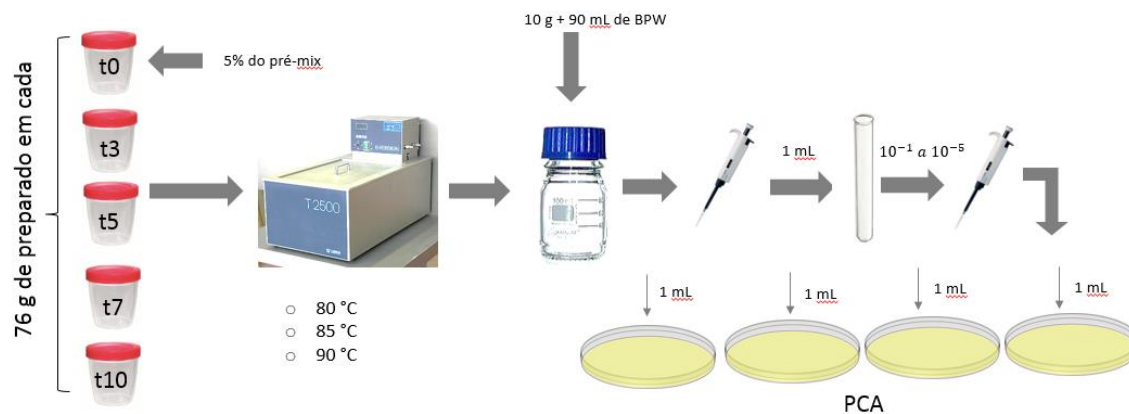


Figura 13. Esquema representativo do processamento térmico dos diferentes preparados em estudo.

### 3.3 Análises microbiológicas

Nas análises microbiológicas efetuadas foram apenas quantificados os mesófilos totais de acordo com a norma ISO 4483-1:2013 (Subcommittee SC 9, 2013) e norma interna específica PE.01 da Frulact. Assim como foi considerada a norma ISO 7218:2007 (European Committee for Standardization, 2007) para limitar o número de colónias viáveis, em alguns casos.

#### 3.3.1 Quantificação de mesófilos totais

Com o auxílio de uma micropipeta (VWR Ergonomic High Performance pipet, Belgium) colocou-se 1 mL da suspensão inicial de cada amostra em placas de Petri e, posteriormente adicionou-se o PCA, pelo método de incorporação. De seguida foram efetuadas as diluições sucessivas, onde se retirou 1 mL da suspensão inicial da amostra que foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 9 mL de BPW, e assim sucessivamente até se completarem as cinco diluições 9:1 previamente estipuladas. Este procedimento foi realizado em quadruplicado dentro da câmara de fluxo laminar (Faster Smart Fast, Italy).

De seguida, todas as placas foram colocadas numa estufa a 30 °C durante 72 h para se proceder no final à contagem de colónias de *B. cereus* resistentes ao processamento térmico nas diferentes condições estudadas.

### 3.4 Análise de resultados

Os resultados obtidos no decurso deste trabalho foram sujeitos a um tratamento estatístico, tendo sido calculada a média aritmética dos valores obtidos na quantificação da carga microbiana entre dois ensaios, bem como calculado o desvio-padrão correspondente. Adicionalmente, de modo a identificar diferenças significativas entre os diferentes binómios de ingredientação aplicados, utilizou-se o suplemento de Análise de Dados do programa *Microsoft Office Excel* e, aplicou-se o teste *Anova* fator único com nível de significância 0.05.

Por último, foram obtidos todos os valores de  $R^2$  associado a cada um dos ajustes lineares efetuados para calcular os parâmetros cinéticos de morte térmica.



## Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Todos os resultados apresentados nesta seção foram sujeitos a análise estatística, encontrando-se todos os valores desta análise especificados em anexo.

### 4.1 Avaliação do impacto dos diferentes binômios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização na carga microbiana dos preparados de cereais

Foram avaliados dois binômios de ingredientação – 30 °C/3 h e 50 °C/3 h – em quatro preparados de cereais diferentes, inoculados com 1 % de *B. cereus* (Figura 14), apresentando, ao final de 3 h, crescimento microbiano em todos eles. Este crescimento possibilitou a realização do tratamento térmico (pasteurização) e, conseqüentemente à determinação da carga microbiana final permitindo o cálculo dos parâmetros de morte térmica.

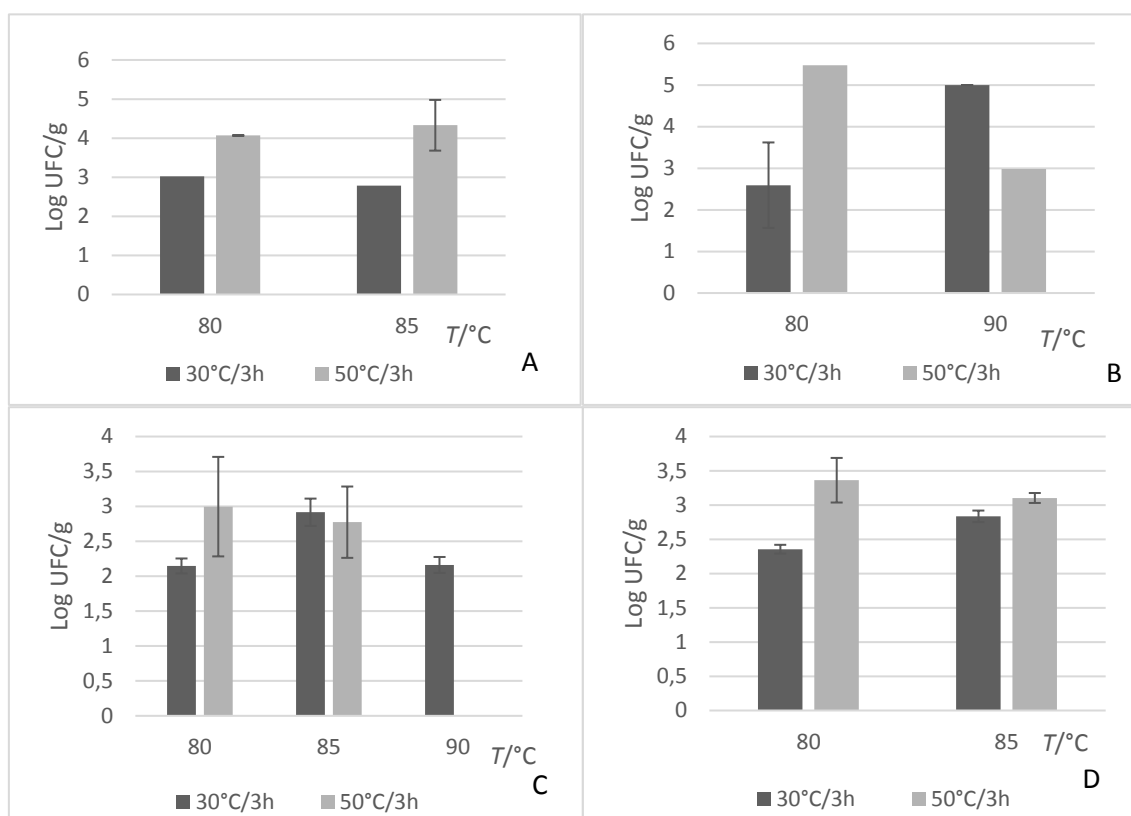


**Figura 14.** *Bacillus cereus*. Imagem real captada durante a contagem de placas.

#### 4.1.1 Efeito da temperatura na termorresistência bacteriana

Após a análise da carga microbiana para cada binômio temperatura/tempo aplicados aos diferentes preparados, obtiveram-se os resultados ilustrados na Figura 15 (sumariados em detalhe no anexo A), que correspondem à média da carga total ao longo do tempo (0, 3, 5, 7 e 10 minutos).

É de notar que apenas são usados os valores que se encontram dentro dos limites de detecção da técnica de acordo com a norma ISO 4483-1:2013, particularmente a norma ISO 7218:2017 (contagens de colónias superiores a 10 e inferiores a 300) (European Committee for Standardization, 2007; Subcommittee SC 9, 2013).



**Figura 15.** Carga microbiana total obtida em cada um dos binómios de ingredientação às diferentes temperaturas de pasteurização. A - Preparado 1; B - Preparado 2; C - Preparado 3; D - Preparado 4

Da análise da Figura 15, é possível constatar que, na sua generalidade, *B. cereus* apresenta uma maior carga microbiana quando lhe é aplicado o binómio temperatura/tempo de 50 °C/3 h, facto que pode ser justificado por esta bactéria ser formadora de esporos e esta temperatura se revelar uma condição de *stress* para o seu desenvolvimento (Voort, 2008). No entanto, não implica que as todas estruturas formadas (esporos e células vegetativas) a esta temperatura sejam mais resistentes do que as que se formam à temperatura de 30 °C, podendo originar resultados diferentes quando aplicado o binómio temperatura/tempo de pasteurização.

Para além disso, pode observar-se que só existem valores exequíveis de carga microbiana à temperatura de 90 °C no caso do Preparado 3 (Figura 15C) segundo as condições do binómio de

ingredientação 30 °C/3 h, de onde se conclui que esta temperatura de pasteurização, independentemente do binómio de ingredientação, é suficiente para eliminar a maior parte de *B. cereus* presente na amostra inicial. No entanto, estes dados não se revelaram estatisticamente significativos ( $p > 0.05$ ;  $F < F_{\text{crítico}}$ ), tal como é possível ver na Tabela C3 (Anexo C). É importante notar que a técnica usada para a determinação do número total de bactérias apresenta uma grande variabilidade o que justifica não só os desvios elevados, como também a falta de significância estatística verificada em alguns ensaios.

Contudo, pela análise dos dados apresentados no anexo B, é possível constatar que não foi possível eliminar totalmente o *B. cereus*, uma vez que ao fim dos 10 minutos de tratamento térmico existem colónias viáveis, ainda que poucas. Por exemplo, no binómio de ingredientação 30 °C/3 h do Preparado 1, à temperatura de 90 °C ao fim de 10 minutos ainda existem colónias viáveis correspondentes a  $1.747 \pm 1.349$  log UFC/g. Reforça-se que estes resultados não estão de acordo com a norma ISO 7218:2017 (European Committee for Standardization, 2007) (i.e. tem um número de colónias inferior a 10). Estes resultados repetem-se ao longo da atividade experimental em todos os preparados, exceto para o Preparado 2, onde a aplicação dos binómios de ingredientação e pasteurização, 50 °C/3 h e 90 °C/3 min, respetivamente, eliminam por completo *B. cereus* (Tabela B2, anexo B).

#### 4.1.1.1 *Determinação dos parâmetros cinéticos de morte térmica*

A partir da análise estatística, realizada de acordo com as normas ISO 4483-1:2013 e ISO 7218:2007 (European Committee for Standardization, 2007; Subcommittee SC 9, 2013), assim como a norma interna específica PE.01 da Frulact, sumariada no anexo C (Tabelas C1, C2, C3 e C4), constatou-se que as condições que levam a resultados estatisticamente significativos são as inerentes aos Preparados 3 e 4, indicando que nestes casos houve diferenças significativas entre as cargas microbianas associadas aos binómios de ingredientação estudados. O facto destes preparados revelarem resultados estatisticamente significativos pode dever-se, possivelmente, às diferenças existentes entre os binómios de ingredientação, uma vez que o binómio temperatura/tempo de ingredientação 50 °C/3 h aliado à ausência de água pode tornar-se uma condição de *stress*, expressando-se neste resultado. Nesse sentido, no Preparado 4 duas condições revelaram-se significativas (i.e. quando o mesmo foi submetido às temperaturas de pasteurização de 80 °C e 85 °C), enquanto que no Preparado 3 apenas uma condição demonstrou

ser estatisticamente significativa (i.e. quando o preparado foi submetido à temperatura de pasteurização de 80 °C). Adicionalmente, quando os dados do anexo B, em que se utilizaram os valores abaixo do limite de deteção da técnica, foram submetidos à mesma análise, as conclusões estatísticas mostraram-se as mesmas. Ou seja, tanto o preparado 3, quando submetido à temperatura de pasteurização de 80 °C, como o preparado 4, quando submetido às temperaturas de pasteurização de 80 °C e 85 °C, revelaram resultados estatisticamente significativos.

Na Tabela 9, encontram-se sumariados os valores de  $D_z$  e  $z$  obtidos para todos os preparados, exceto para o Preparado 2 no binómio temperatura/tempo de ingredientação 50 °C/3 h, uma vez que não foi possível obter o valor de  $z$  nestas condições.

Os resultados obtidos para o Preparado 4 foram os selecionados para a discussão, uma vez que foi o que apresentou o maior conjunto de resultados estatisticamente significativos. Os restantes resultados correspondentes aos Preparados 1, 2 e 3 estão detalhados no anexo D. Na Tabela 9, os valores que se encontram assinalados a vermelho são os que foram obtidos a partir dos resultados do anexo B, onde se consideraram nos cálculos, os valores que se encontram abaixo do limite de deteção da técnica de acordo com a norma ISO 7218:2007 (European Committee for Standardization, 2007). Todos os restantes resultados foram obtidos com base no anexo A.

**Tabela 9.** Sumário dos valores de  $D_z$  e  $z$  obtidos para cada um dos preparados de cereais nos diferentes binómios de ingredientação

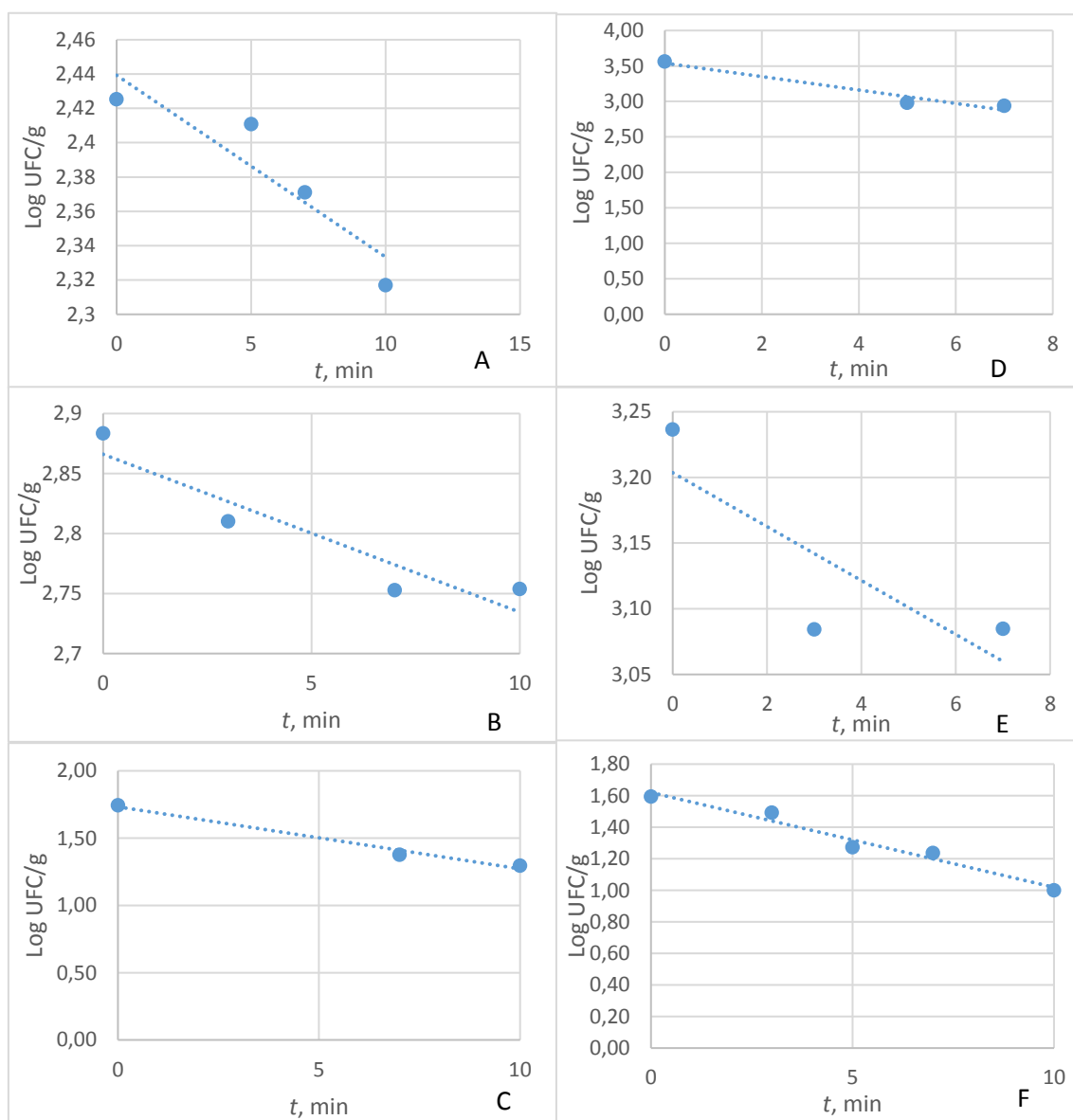
	Binómio de ingredientação	$D$ -value (min)			$z$ (°C)
		80 °C	85 °C	90 °C	
Preparado 1	30 °C/3 h	11.7	7.5	7.8	58.5
	50 °C/3 h	10.1	8.0	7.3	70.4
Preparado 2	30 °C/3 h	10.2	4.1	2.4	15.8
	50 °C/3 h	2.3	2.3	3.8	-
Preparado 3	30 °C/3 h <sup>1</sup>	34.7	19.6	67.6	20.2
	50 °C/3 h <sup>1</sup>	6.5	2.8	13.8	13.3
Preparado 4	30 °C/3 h	94.3	75.8	21.7	15.7
	50 °C/3 h <sup>1</sup>	10.6	48.8	16.6	10.7

<sup>1</sup> Só se usaram dois pontos pois os valores eram muito variáveis



O Preparado 4 corresponde a um preparado de cereais ao qual foi adicionado ácido cítrico ( $\text{pH} = 4 \pm 0.2$ ) e se diminuiu a disponibilidade de água ( $A_w \geq 0.90$ ), que por sua vez fez com que a quantidade de sólidos solúveis aumentasse ( $^{\circ}\text{Brix} = 58 \pm 2$ ).

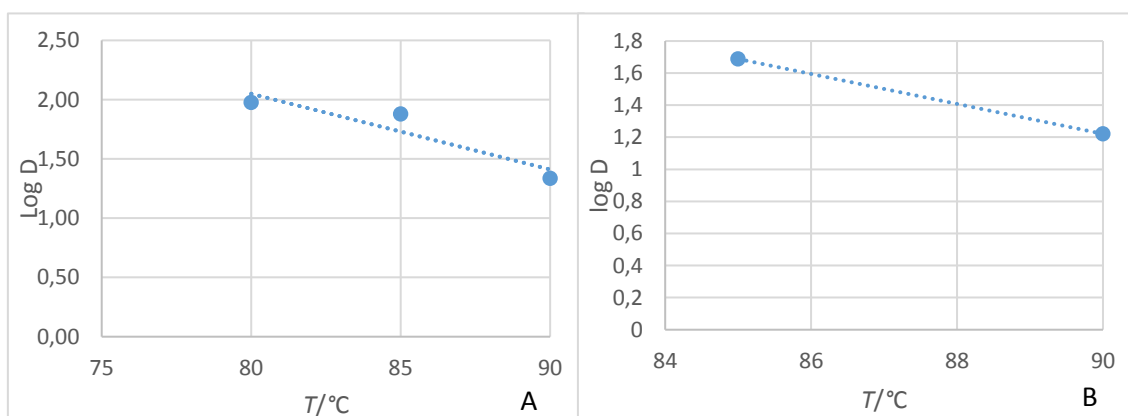
Para determinar os valores de  $D_T$  do Preparado 4, os dados que constam nas Tabelas B4 e C4 dos anexos B e C, respectivamente, foram avaliados em função do tempo de pasteurização, sendo que posteriormente se obteve a Figura 16, bem como as equações das retas correspondentes (anexo D) que permitiram o cálculo do valor de  $D_T$ .



**Figura 16.** Valores de  $D_T$  determinados para o Preparado 4 sujeito a diferentes binômios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização. A – 30 °C/3 h, 80 °C/10 min; B – 30 °C/3 h, 85 °C/10 min; C – 30 °C/3 h, 90 °C/10 min; D – 50 °C/3 h, 80 °C/10 min; E – 50 °C/3 h, 85 °C/10 min; F – 50 °C/3 h, 90 °C/10 min.

A determinação dos valores de  $D_T$  para os outros preparados foi similar, a única diferença foi que o Preparado 4 apresentou uma maior quantidade de resultados estatisticamente significativos permitindo dessa forma uma análise mais consistente. Numa primeira análise em que se usaram apenas os valores de contagens totais de bactérias acima de 10 e abaixo de 300 colônias não foi possível obter dados suficientes para o cálculo de  $D_T$  e  $z$  no Preparado 4. Nesse sentido, em alguns casos (valores destacados a vermelho na Tabela 9) foi necessário recorrer aos valores do anexo B, obtendo-se assim os valores de  $D_T$  através do cálculo do inverso negativo do declive das equações das retas da representação gráfica do logaritmo das UFC/g em função do tempo de pasteurização (Figura 16). Posteriormente, a partir do logaritmo de  $D_T$  em função das temperaturas de pasteurização, foram determinados os valores de  $z$ , igualmente através do cálculo do inverso negativo do declive das equações das retas representadas na Figura 17, onde em certos casos apenas se utilizaram dois valores uma vez que a tendência das retas era muito variável. Não sendo naturalmente desejável a determinação destes parâmetros com um número tão reduzido de pontos, o tempo para a realização deste trabalho não permitiu que fossem realizados mais ensaios por forma a tornar mais robustas as conclusões a retirar. Nesse sentido, alguns dos resultados apresentados constituem apenas uma indicação dos possíveis parâmetros de morte térmica e terão que futuramente ser validados com um maior número de dados experimentais.

Os resultados aqui apresentados permitiram aferir que as bactérias presentes no Preparado 4 são eliminadas mais facilmente quando se usam os binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização de 50 °C/3 h e 90 °C/10 min, respetivamente.



**Figura 17.** Valores de  $z$  determinados para o Preparado 4 sujeito a diferentes binómios temperatura /tempo de ingredientação e pasteurização. A – 30 °C/3 h; B – 50 °C/3 h

Da Tabela 9, constata-se que, genericamente, *B. cereus* apresenta um maior crescimento microbiano quando submetido a uma temperatura de pasteurização menor, neste caso 80 °C. Tal seria de esperar, uma vez que como este microrganismo é termorresistente e apresenta crescimento em todos os binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização estudados e, por isso a 80 °C (temperatura menor) seria expectável que o seu crescimento fosse maior. Em todos os preparados, o valor de  $D_T$  vai diminuindo à medida que a temperatura vai aumentando, ou seja vai sendo preciso menos tempo para destruir 90 % da população o que está de acordo com o expectável (Adams & Moss, 2008).

De uma forma geral, verifica-se que quando aplicado o binómio temperatura/tempo de ingredientação de 30 °C/3 h, independentemente do preparado, *B. cereus* torna-se mais termorresistente, necessitando de um intervalo de temperatura mais elevado para alterar num ciclo logarítmico o valor de  $D_T$ , exceto para o caso do Preparado 1, onde o binómio temperatura/tempo de ingredientação 50 °C/3 h é o que apresenta resultados mais elevados de temperatura necessária à eliminação de *B. cereus*. Esse facto pode dever-se à elevada carga microbiana total associada a este binómio de ingredientação (Figura 16). Ou seja, nestes casos, é necessário aplicar um valor de  $z$  mais elevado no binómio de ingredientação temperatura/tempo de 30 °C/3 h para que se atinjam resultados mais favoráveis à eliminação desta bactéria (resultados também observados para o Preparado 4). O facto de *B. cereus* se revelar mais termorresistente quando se usa 30 °C em vez de 50 °C na fase de ingredientação, pode dever-se ao facto desta temperatura ser mais favorável ao seu desenvolvimento aumentando a carga microbiana inicial (subcapítulo 2.3.1, Tabela 1).

Este resultado é curioso tendo em conta o que se discutiu no subcapítulo 4.1.1, onde o binómio temperatura/tempo de ingredientação a 50 °C/3 h apresentava valores mais elevados de carga microbiana. Estas discrepâncias podem ser justificadas pelo facto de a uma temperatura de 50 °C poderem ser formadas estruturas resistentes (esporos) e células vegetativas, onde as segundas, quando aplicados os binómios temperatura/tempo de pasteurização, à mínima temperatura, comecem a ceder e, apenas restem os esporos.

## 4.2 Avaliação do impacto dos fatores intrínsecos na termorresistência bacteriana

Nesta subsecção avaliou-se o impacto que os fatores intrínsecos estudados, nomeadamente, o pH e a  $A_w$ , auferem na termorresistência de *B. cereus*. Para isso, os preparados de cereais estudados foram emparelhados dois a dois para permitir a sua comparação.

Adicionalmente, a avaliação efetuada teve em conta o valor de  $D_T$  no binómio de pasteurização de 80 °C/10 min, assim como o valor de  $z$  correspondente, para ambos os binómios temperatura/tempo de ingredientação.

É de salientar que, foi utilizado o binómio de pasteurização de 80 °C/10 min, uma vez que neste foi possível obter valores de carga microbiana em todos os pontos, porque se trata do binómio de pasteurização onde, em geral, se verificou mais crescimento de microrganismos dado ser a temperatura mais baixa em estudo.

### 4.2.1 Efeito da acidez

De forma a avaliar o efeito do pH, emparelharam-se os resultados do Preparado 1 com o Preparado 2 e o Preparado 3 com o Preparado 4, onde em ambos os casos se comparam um preparado com  $\text{pH}=4 \pm 0.2$  (mais ácido) a outro com  $\text{pH}=5.5 \pm 0.2$  (menos ácido).

Teoricamente, a redução do pH num alimento contribui para reduzir a capacidade de desenvolvimento microbiano (Baptista & Venâncio, 2003), pelo que os Preparados 2 e 4 devem ser aqueles em que o crescimento microbiano é menos visível, necessitando portanto de temperaturas mais baixas para a eliminação da bactéria. Para além desta constatação, de acordo com a literatura, a gama de valores de pH em que *B. cereus* se desenvolve situa-se entre 4.9 e 10.0, encontrando-se o pH ótimo entre 6.0 e 7.0. Assim, a conclusão será a mesma, ou seja, nos Preparados 2 e 4 prevê-se que exista menos crescimento microbiano, uma vez que o seu pH está fora da gama de desenvolvimento da bactéria estudada.

Na Tabela 10, encontram-se os valores  $D_{80^\circ\text{C}}$  e  $z$  para os Preparados 3 e 4, sendo que os resultados dos Preparados 1 e 2 se encontram no anexo E.

**Tabela 10.** Valores de  $D_{80^{\circ}\text{C}}$  e  $z$  obtidos para os Preparados 3 e 4

	Binómio de ingredientação	<i>D-value (min)</i>		$z$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
		80 $^{\circ}\text{C}$		
Preparado 3	30 $^{\circ}\text{C}/3$ h	34.7		20.2
	50 $^{\circ}\text{C}/3$ h	6.5		13.3
Preparado 4	30 $^{\circ}\text{C}/3$ h	94.3		15.7
	50 $^{\circ}\text{C}/3$ h	10.6		10.7

Da análise da Tabela 10 é possível afirmar que no Preparado 3 é necessário um intervalo de temperatura (valor de  $z$ ) maior para eliminar a bactéria em questão para ambos os binómios temperatura/tempo de ingredientação estudados. Tratando-se este preparado de uma solução menos ácida do que o Preparado 4 e, estando o seu pH inserido na gama de crescimento de *B. cereus* o resultado está de acordo com o expectável. No entanto, olhando também para os valores de  $D_T$ , constata-se que embora no Preparado 4 seja necessária uma temperatura menor para eliminar a bactéria, é também necessário mais tempo para diminuir a população em 90 %. Este facto pode estar relacionado com a formação de estruturas mais resistentes, devido às condições de *stress* causadas pelo pH ácido conferido a este preparado.

Claramente, observando os resultados obtidos para os Preparados 1 e 2 (Tabela E1, anexo E), as conclusões que podem ser retiradas são similares. Ou seja, o Preparado 1, tal como esperado, uma vez que se trata de uma solução menos ácida, proporciona melhores condições ao desenvolvimento de *B. cereus*, e por isso apresenta valores temperatura necessária à eliminação desta bactéria mais elevados.

#### 4.2.2 Efeito da atividade da água

De forma a avaliar o efeito da  $A_w$ , emparelharam-se o Preparado 1 com o Preparado 3 e o Preparado 2 com o Preparado 4, ou seja, comparam-se preparados com  $A_w > 0.95$  e  $^{\circ}\text{Brix} = 12 \pm 2$  com preparados com  $A_w \geq 0.90$  e  $^{\circ}\text{Brix} = 58 \pm 2$ .

Teoricamente, a diminuição da  $A_w$  (devido à adição de sal, açúcar, secagem ou cura), resulta na inibição do crescimento microbológico (Petruzzi et al., 2016), o que nestes casos indica que

os Preparados 3 e 4 devem ser aqueles em que o crescimento microbiano é menos visível, necessitando de temperaturas mais baixas para a bactéria ser eliminada. Para além desta constatação, de acordo com a literatura, a gama de  $A_w$  em que *B. cereus* se desenvolve é entre 0.93 e 0.99. Nesse sentido, a conclusão que se obtém é a mesma, ou seja, nos Preparados 3 e 4 prevê-se que exista menos crescimento microbiano, uma vez que a água disponível não é suficiente para desenvolvimento desta bactéria.

Na Tabela 11, encontram-se os valores  $D_{80^\circ\text{C}}$  e  $z$  para os Preparados 1 e 3, sendo que os resultados dos Preparados 2 e 4 se encontram na Tabela E2 do anexo E.

**Tabela 11.** Valores de  $D_{80^\circ\text{C}}$  e  $z$  obtidos para os preparados 1 e 3

	Binómio de ingredientação	<i>D-value</i> (min)	
		80 °C	$z$ (°C)
Preparado 1	30 °C/3 h	11.6	58.5
	50 °C/3 h	10.1	70.4
Preparado 3	30 °C/3 h	34.7	20.2
	50 °C/3 h	6.5	13.3

Da análise da Tabela 11, pode constatar-se que para o Preparado 1 é necessário um intervalo de temperatura (valor de  $z$ ) maior para eliminar a bactéria em questão em ambos os binómios temperatura/tempo de ingredientação estudados. Tratando-se este preparado de uma solução com mais água disponível, assim como menos quantidade de sólidos solúveis que o Preparado 3 e, estando os seus valores de  $A_w$  inseridos na gama de crescimento de *B. cereus* os resultados obtidos estão de acordo com o expectável. No entanto, olhando também para os valores de  $D_r$ , verifica-se que embora no Preparado 3 seja necessária uma temperatura menor para eliminar a bactéria, é também necessário mais tempo para diminuir a população em 90%. Este facto pode estar relacionado com a característica protetora que o açúcar confere às bactérias, formando uma barreira à atuação do calor proporcionando condições ótimas à formação de estruturas mais resistentes, como é o caso dos esporos (Sutherland & Limond, 1993).

Da mesma forma, observando os resultados obtidos para os Preparados 2 e 4 (Tabela E2, anexo E), as conclusões retiradas são idênticas. Ou seja, o Preparado 2, tal como seria esperado, uma vez que se trata de uma solução com mais água disponível, proporciona melhores condições

ao desenvolvimento de *B. cereus*, e por isso apresenta valores temperatura necessária à eliminação desta bactéria mais elevados.

#### 4.3 Avaliação do impacto de todos os fatores inerentes ao crescimento microbiano

Analisando todos os pontos anteriormente discutidos, é possível concluir quais as condições ideais para a eliminação do *B. cereus*, tendo em conta as necessidades da empresa, bem como o menor custo associado ao processo. Para além disso, a definição dessas condições tem ainda em consideração a preservação das características organolépticas dos preparados de cereais, ou seja, não deverão ser drasticamente alteradas para que não seja comprometida a sua qualidade alimentar. Assim, torna-se importante a utilização de temperaturas mais baixas, ou seja que induzem menores alterações nos preparados tendo-se para o efeito escolhido o binómio temperatura/tempo de ingredientação 30 °C/3 h, embora este tenha apresentado valores mais elevados de termorresistência.

De acordo com os estudos de Sutherland e Limond (1993), pode afirmar-se que níveis elevados de glucose (correspondendo a valores inferiores de  $A_w$ ), assim como valores de pH baixos permitem controlar a produção da toxina de *B. cereus* causadora de diarreia, factos esses que explicam a ausência destas toxinas em sobremesas. Por um lado, e olhando para as características dos preparados (subcapítulo 3.2.1) e para os resultados apresentados na Tabela 9, constatou-se que o Preparado 4 é o que melhor reflete as conclusões do estudo acima mencionado. Ou seja, o Preparado 4 revelou ser aquele em que houve menos desenvolvimento microbiano e no qual é necessário um intervalo de temperatura menor para eliminar a bactéria em questão, no entanto exige mais tempo para reduzir a população existente. Por outro lado, observando os resultados obtidos no binómio temperatura/tempo de ingredientação para o Preparado 2, em termos de temperatura (valor de  $z$ ) este revelou-se idêntico ao Preparado 4, no entanto em todos os binómios temperatura/tempo de pasteurização este apresenta valores de  $D_T$  muitos inferiores aos determinados para o Preparado 4. Dessa forma, ficam excluídas as condições inerentes ao Preparado 4 como sendo as mais favoráveis à eliminação de *B. cereus*, continuando a considerar-se apenas o Preparado 2 nesta avaliação preliminar.

Relativamente ao Preparado 1, este revela-se como sendo aquele que aufere melhores condições à resistência de *B. cereus*, uma vez que a este estão inerentes condições ótimas de

crescimento ( $pH= 5.5$  e  $A_w > 0.95$ ) estando-lhe associados valores de  $z$  elevados em ambos os binómios de ingredientação estudados assim como baixos valores de  $D_T$ .

No caso do Preparado 3, embora este necessite de um intervalo de temperatura relativamente baixo, também requiere mais tempo para reduzir a população em 90 %. No entanto, observando a Tabela 12, verifica-se que a partir dos valores de  $D_T$  e  $z$  do Preparado 3, aplicando a equação 3, presente no subcapítulo 2.5.4, e considerando a redução de *B.cereus* em 6 ciclos logarítmicos, a 100 °C (FDA, 2016), obtém-se para um binómio temperatura/tempo de ingredientação de 50 °C/3 h, um binómio temperatura/tempo de pasteurização de 100°C/1 min. Este resultado *a priori* parece o ideal para a eliminação de *B.cereus*, contudo o mesmo foi obtido utilizando o valor de  $z$  correspondente, tendo sido este determinado apenas através de dois pontos, tal como está assinalado na Tabela 9. Desta forma, não pode ser considerado fiável o valor obtido nesta simulação, ficando também excluído o Preparado 3.

**Tabela 12.** Simulação do binómio temperatura/tempo de pasteurização adequado à eliminação de *B.cereus* no preparado 3

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização
30 °C/3 h	100 °C/21 min
50 °C/3 h	100 °C/ 1 min

Em suma, tendo em conta o que foi descrito anteriormente, as condições do Preparado 2, nomeadamente,  $D_{80°C} = 10.2$  min;  $z = 15.8$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 30 °C/3 h, revelaram-se as mais favoráveis à eliminação de *B. cereus*, necessitando de intervalos de temperatura e tempo inferiores para reduzir a população bacteriana em 90 %. Observando os resultados da Tabela 9 para este preparado, embora os binómios temperatura/tempo de pasteurização mais elevados sejam os mais eficazes (como é o caso do binómio temperatura/tempo de pasteurização 90 °C/10 min), aquele que trará menos alterações a nível organolético é o binómio temperatura/tempo de pasteurização 80 °C/10 min garantindo assim, a segurança e qualidade alimentar do preparado e do produto onde será inserido.

Por forma a garantir a eliminação de *B.cereus*, a partir dos valores de  $D_T$  e  $z$  do Preparado 2, utilizou-se a equação 3, presente no subcapítulo 2.5.4, e considerou-se a redução de *B.cereus* em 6 ciclos logarítmicos, a 100 °C (FDA, 2016), obtendo-se os resultados para o binómio temperatura/tempo de pasteurização adequado, apresentado na Tabela 13.



**Tabela 13.** Simulação do binómio temperatura/tempo de pasteurização adequado à eliminação de *B.cereus* no preparado 2

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização
30 °C/3 h	100 °C/3 min

(Nota: Encontram-se no anexo F, os resultados obtidos para os restantes preparados)

Observando, ainda, estes resultados pode dizer-se que de uma forma geral, as condições do Preparado 2 revelaram-se as mais proveitosas para a empresa implementar nas suas fábricas uma vez que são aquelas que acarretam menos custos energéticos para a mesma.



## Capítulo 5 – Conclusões finais e Recomendações

Após a análise dos dados obtidos pode afirmar-se que os objetivos propostos neste projeto foram cumpridos, nomeadamente a avaliação do comportamento de *B. cereus* em preparados de cereais com condições distintas de  $A_w$  e pH, bem como quando exposta a diferentes binómios de temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização. Especificamente, foram determinados os parâmetros cinéticos de morte térmica de *B. cereus* para cada condição (valores de  $D_T$  e  $z$ ).

É de salientar que a carga microbiana inicial exibida em todos os preparados, ao fim de ambos os binómios temperatura/tempo de ingredientação estudados, 30 °C/3 h e 50 °C/3 h, foi idêntica (> 300 colónias). No entanto, depois de aplicados os binómios de temperatura/tempo de pasteurização obteve-se mais carga microbiana total no binómio de ingredientação 50 °C/3 h. Posteriormente, através das análises foi possível constatar que, de acordo com o descrito na literatura, elevados níveis de  $A_w$  potenciam o crescimento microbiano, revelando-se os Preparados 1 e 2, os mais termorresistentes uma vez que exibem valores de  $A_w$  mais elevados (> 0.95) resultando em valores de  $z$  mais elevados comparativamente com os Preparados 3 e 4, respetivamente. Nesse sentido, para o Preparado 1 (pH=5.5 e  $A_w > 0.95$ ) obteve-se  $D_{80^\circ\text{C}} = 11.6$  min;  $z = 58.5$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 30 °C/3 h e  $D_{80^\circ\text{C}} = 10.1$  min;  $z = 70.4$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 50 °C/3 h. No caso do Preparado 2, o qual tinha um pH mais ácido (pH=4) e por isso menos favorável ao desenvolvimento de *B. cereus* obteve-se  $D_{80^\circ\text{C}} = 10.2$  min;  $z = 15.8$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 30 °C/3 h e  $D_{80^\circ\text{C}} = 2.3$  min, a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 50 °C/3 h (neste caso, não foi possível a determinação de  $z$ ). Comparando o Preparado 3 (pH=5.5 e  $A_w \geq 0.90$ ) com o Preparado 4 (pH=4 e  $A_w \geq 0.90$ ), verificou-se que o Preparado 3 era mais termorresistente apresentando  $D_{80^\circ\text{C}} = 34.7$  min e  $z = 20.2$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 30 °C/3 h, bem como  $D_{80^\circ\text{C}} = 6.5$  min e  $z = 13.3$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 50 °C/3 h. Para o Preparado 4 obteve-se  $D_{80^\circ\text{C}} = 94.3$  min e  $z = 15.7$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 30 °C/3 h, bem como  $D_{80^\circ\text{C}} = 10.6$  min e  $z = 10.7$  °C a um binómio de temperatura/tempo de ingredientação de 50 °C/3 h. Desta forma foi possível constatar que em termos de valores associados a  $z$ , as condições do Preparado 4 seriam à partida as ideais à eliminação de *B. cereus* uma vez que apresenta um valor de  $z$  mais baixo. No entanto, olhando para os valores de  $D_T$  e tendo em consideração os custos associados a cada uma das condições,

conclui-se que as condições do Preparado 2 são aquelas que melhor se adaptam às necessidades da empresa a todos os níveis.

Por último, pode afirmar-se que os resultados de ensaios anteriores foram validados com sucesso, uma vez que o *B. cereus* se revelou mais termorresistente quando lhe foi aplicado um binómio temperatura/tempo de ingredientação de 30 °C/3 h, tal como tinha já sido reportando anteriormente em projetos desenvolvidos na Frulact.

Em trabalhos futuros recomenda-se a utilização de uma quantidade de inóculo maior, ou seja, iniciar os ensaios com uma carga microbiana inicial superior, de forma a permitir o cálculo dos valores  $D_T$  e  $z$  nas temperaturas mais elevadas e em todos os pontos, respeitando as normas em vigor, nomeadamente as normas ISO 4483-1:2013 e ISO 7218:2007 (European Committee for Standardization, 2007). Para além disso, seria interessante avaliar a carga microbiana em iogurtes depois de incorporar os preparados nos mesmos, e verificar se o pH inerente a estes produtos lácteos teria alguma influência no desenvolvimento microbiano. Ou seja, teoricamente seria de esperar que *B. cereus* não se desenvolvesse com tanta facilidade, uma vez que os iogurtes têm um pH mais ácido. Adicionalmente, também seria vantajoso conduzir os preparados de cereais a um estudo organolético, de maneira a determinar os efeitos do calor nas propriedades nutricionais dos mesmos.

## Referências bibliográficas

- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). The Microbiology of Food Preservation. In *Food Microbiology* (3ª, pp. 63–115). Reino Unido: The Royal Society of Chemistry.
- Azevedo, C., & Sunkel, C. E. (2012). A Célula Procariota. In *Biologia Celular e Molecular* (5ª edição, p. 41). Lisboa: Lidel - Edições Técnicas Lda.
- Baptista, P., & Venâncio, A. (2003). *Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. Os Perigos para a Segurança Alimentar no Processamento de Alimentos* (Vol. 4).
- Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2011). The Microbiology of Cereals and Cereal Products. Consultado no dia 11 de março de 2018, em <http://www.foodqualityandsafety.com/article/the-microbiology-of-cereals-and-cereal-products/>
- Chapman, B., Winley, E., Fong, A. S. W., Hocking, A. D., Stewart, C. M., & Buckle, K. A. (2007). Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(4), 531–534. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.011>
- Cheon, H. S., Cho, W. Il, Yi, J. Y., & Chung, M. S. (2015). Optimization of sterilization conditions for retorted meatballs based on prediction of heat penetration. *Food Science and Biotechnology*, 24(5), 1661–1666. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0215-8>
- Regulamento (CE) n.º 1441/2007. *Jornal Oficial Da União Europeia*, L 322 (Altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios), 12–29. Consultado no dia 11 de março de 2018, em <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1441&from=EN>
- Cortés-Sánchez, A. de J., Díaz-Ramirez, M., & Salgado-Cruz, M. de la P. (2017). *s cereus* : Food, Health and Biotechnology. *Agroproductividad*, 10(January), 3–9.
- COTEC. (2013). Frulact, Indústria Agro-Alimentar, S.A. Consultado no dia 13 de janeiro de 2018, em <http://www.cotecportugal.pt/pt/quem-somos/associados/frulact-industria-agro-alimentar-sa>

- Custer, C. S. (2014). *History of Food Microbiology (A Brief)*. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00165-8>
- Duport, C., Jobin, M., & Schmitt, P. (2016). Adaptation in *Bacillus cereus*: From stress to disease. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01550>
- Erkmen, O., & Bozoglu, T. F. (2016a). History and Development of Food Microbiology. *Food Microbiology: Principles into Practice*, 3–12. <https://doi.org/10.1002/9781119237860.ch01>
- Erkmen, O., & Bozoglu, T. F. (2016b). Spoilage of Cereals and Cereal Products. In *Food Microbiology: Principles into practice* (1ª, pp. 441–457). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100220-9.00016-3>
- European Committee for Standardization. (2007). ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations. *International Standard Organization, 7218*, 57. <https://doi.org/10.1007/s11367-011-0297-3>
- FAO. (1999a). Major Chemical Components of Cereal Grains. Consultado no dia 28 de março de 2018, em <http://www.fao.org/docrep/x2184e/x2184e04.htm>
- FAO. (1999b). Nutritional quality of cereals. Consultado no dia 28 de março de 2018, em <http://www.fao.org/docrep/x2184e/x2184e05.htm>
- FDA. (2016). Hazard Analysis and Risk-Based Preventive Controls for Human Food : Guidance for Industry. *Food and Drug Administration*, 185.
- Fernandes, F. (2013). Frulact, a multinacional da fruta. Consultado no dia 13 de janeiro de 2018, em [http://www.jornaldenegocios.pt/negocios-iniciativas/premio-excellens-oeconomia/detalhe/frulact\\_a\\_multinacional\\_da\\_fruta](http://www.jornaldenegocios.pt/negocios-iniciativas/premio-excellens-oeconomia/detalhe/frulact_a_multinacional_da_fruta)
- Food Safety Authority of Ireland. (2015). Predictive Microbiology and Shelf-life. Consultado no dia 28 de março de 2018, em [https://www.fsai.ie/faq/shelf\\_life/predictive\\_microbiology.html](https://www.fsai.ie/faq/shelf_life/predictive_microbiology.html)
- Food Standards Australia New Zealand. (2013). *Bacillus cereus*, 11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07703.x>
- Fraç, M., Jezierska-Tys, S., & Yaguchi, T. (2015). Occurrence, Detection, and Molecular and

- Metabolic Characterization of Heat-Resistant Fungi in Soils and Plants and Their Risk to Human Health, *132*, 161–204. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.02.003>
- Gaillard, S., Leguerinel, I., & Mafart, P. (1998). Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Food Science*, *63*(5), 887–889. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb17920.x>
- Gibbs, P. A., & Silva, F. (2012). Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. *FRIN*, *45*(2), 695–699. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.018>
- Goff, H. D. (2014). Thermal Destruction of Microorganisms. *Dairy Science and Technology Education*, 1–8. Consultado no dia 27 de janeiro de 2018, em <https://www.uoguelph.ca/foodscience/industry-outreach/dairy-education-ebook-series>
- Goff, H. D. (2015). Thermal destruction of microorganisms. Consultado no dia 27 de janeiro de 2018, em <https://www.uoguelph.ca/foodscience/node/2015/>
- Halkman, H. B. D., & Halkman, A. K. (2014). *Indicator Organisms. Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00396-7>
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005a). *Food Protection with High Temperatures, and Characteristics of Thermophilic Microorganisms. Modern Food Microbiology* (7ª Edição). Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/b100840>
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005b). Indicators of Food Microbial Quality and Safety. In *Modern Food Microbiology* (7ª Edição, pp. 491–492). Springer. <https://doi.org/10.1007/b100840>
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005c). Intrinsic and Extrinsic Parameters of Foods That Affect Microbial Growth. In *Modern Food Microbiology* (7ª Edição, pp. 39–59). Springer. <https://doi.org/10.1007/b100840>
- Lelieveld, H. L. M., Mostert, M. A., & Holah, J. (2005). *Handbook of hygiene control in the food industry*. Woodhead Publishing Limited.
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., & Shao, Z. (2017). Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

- Microbiology*, 67(8), 2499–2508. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821>
- McKevith, B. (2004). Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, 29(2), 111–142. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2004.00418.x>
- Mesquita, A. F., Santos, M. E., Silva, A., Baldaia, L., & Félix, J. M. (2012). Imunidade e controlo de doenças. In *Terra, Universo de Vida* (1ª edição, pp. 131–137). Porto: Porto Editora.
- Mina, I. (2014). FUNGI (Fungos). *Microbiologia*.
- Nerín, C., Aznar, M., & Carrizo, D. (2016). Food contamination during food process. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.004>
- Neves, R. (2018). Frulact compra start-up de base vegetal. Consultado no dia 11 de fevereiro de 2018, em <http://www.jornaldenegocios.pt/empresas/industria/detalhe/frulact-compra-start-up-de-base-vegetal>
- Nielsen, O. F., Bilde, M., & Frosch, M. (2012). Water Activity. *Spectroscopy: An International Journal*, 27(5), 565–569. <https://doi.org/10.1155/2012/414635>
- Organic Facts. (2018). Health Benefits of Cereals. Consultado no dia 28 de março de 2018, em <https://www.organicfacts.net/health-benefits/cereal>
- Regulamento N° 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, 31, 1–24.
- Regulamento (CE) n° 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 226/3-226/21.
- Petruzzi, L., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2016). *Microbial Spoilage of Foods: Fundamentals. The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00002-9>
- Portal de Segurança Alimentar. (2014). Microbiologia alimentar. Consultado no dia 18 de fevereiro de 2018, em <http://www.segurancaalimentar.com/conteudos.php?id=23>
- Quali - Segurança Alimentar. (2018). Qualidade Microbiológica dos Alimentos. Consultado no dia 25 de março de 2018, em <https://www.quali.pt/seguranca-alimentar/209-qualidade-microbiologica-alimentos>



- Rodrigues, L. (2015). Constituintes principais dos alimentos. *Ciência e Engenharia dos Alimentos*, 66.
- Rodrigues, L. (2016). Processamento pelo Calor. *Ciência e Engenharia dos Alimentos*, 31.
- Ross, T., McMeekin, T. A., & Baranyi, J. (2014). *Predictive Microbiology and Food Safety. Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edi, Vol. 3). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00256-1>
- Santos, M. I., Correia, C., Cunha, M. I., Saraiva, M. M., & Novais, M. R. (2005). Valores Guia para a avaliação de alimentos cozinhados prontos a comer. *Revista Da Ordem Dos Farmacêuticos*, 64, 66–68.
- Silva, R. (2017). Sistemas de certificação da segurança alimentar : do HACCP ao FSSC 22000. *Publindústria*, 127.
- Simpson, R. (2009a). Heat resistance of microbes targeting the production of safe and stable foods. In *Engineering Aspects of Thermal Food Processing* (pp. 30–32).
- Simpson, R. (2009b). Principles of Thermal Processing: Pasteurization. In *Engineering Aspects of Thermal Food Processing* (pp. 15–17).
- Simpson, R. (2009c). Principles of Thermal Processing: Sterilization. In *Engineering Aspects of Thermal Food Processing* (pp. 3–4).
- Sousa, L. A. M. de. (2017). *Determinação dos parâmetros de cinética de morte térmica em preparados de cereais*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar. Universidade do Minho, 104.
- Sperber, W. H. (1983). Influence of water activity on foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*, 46(2), 142–150. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.2.142>
- Steyn, C. E., Cameron, M., & Witthuhn, R. C. (2011). Occurrence of Alicyclobacillus in the fruit processing environment - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 147(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.004>
- Subcommittee SC 9, M. (2013). ISO 4483-1:2013. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. *International Standard*, 1–9.

- Sutherland, A. D., & Limond, A. M. (1993). Influence of pH and sugars on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus Cereus*. *Journal of Dairy Research*, *60*(4), 575–580. <https://doi.org/10.1017/S0022029900027928>
- te Giffel, M., & Beumer, R. (1999). *Bacillus cereus*: A Review. *The Journal of Food Technology in Africa*, *4*(1), 7–13.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2012). *Microbiologia*. (C. Paludo, Ed.) (10<sup>e</sup>). artmed.
- Victor, N., Bekele, M. S., Ntseliseng, M., Makotoko, M., Peter, C., & Asita, A. O. (2013). Microbial and Physicochemical Characterization of Maize and Wheat Flour from a Milling Company , Lesotho. *International Journal of Food Safety*, *15*(May), 11–19. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12128>
- Voort, M. Van Der. (2008). *Fine tuning of the Bacillus cereus stress response : role of transcriptional regulators Menno van der Voort*. Netherlands.

## Anexos

### A – Carga microbiana associada aos binómios de ingredientação

Os dados que se encontram descritos neste anexo correspondem aos cálculos intermédios realizados de acordo com os limites da deteção da técnica imposta pela norma ISO 7218:2007, ou seja só foram considerados os valores onde o número de colónias presentes se fixou entre 10 e 300 colónias. Posteriormente, foi calculado o número de unidades formadoras de colónias tendo em conta cada uma das diluições em cada ponto do tempo de pasteurização. De seguida, calculou-se o logaritmo de cada um dos valores e obtiveram-se os valores apresentados nas tabelas seguintes.

Por último, calcularam-se a média e o desvio-padrão do logaritmo das unidades formadoras de colónias, por forma a quantificar a carga microbiana associada a cada um dos binómios de ingredientação, considerando apenas os valores acima do limite de deteção. Assim, em alguns casos consideraram-se apenas um ou dois valores (Tabelas A1 e A2), não permitindo portanto a obtenção de resultados fiáveis, sendo que por este motivo não foi possível calcular valores de  $D_r$  e  $z$  para os Preparados 1 e 2.

**Tabela A1.** Média do logaritmo de UFC/g associada aos binômios de ingredientação, ao longo dos binômios de pasteurização correspondentes ao Preparado 1, acompanhada do desvio padrão respetivo

Banho Térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	Log UFC/g					
		30 °C/3 h	Média	Desvio - padrão	50 °C/3 h	Média	Desvio - padrão
80	0	-	-	-	-	-	-
	3	3.026			4.068		
	5	-			-		
	7	-			-		
	10	-			-		
85	0	2.781	-	-	4.302	4.329	0.649
	3	-			-		
	5	-			3.548		
	7	-			5.137		
	10	-			-		

**Tabela A2.** Média do logaritmo de UFC/g associada aos binômios de ingredientação, ao longo dos binômios de pasteurização correspondentes ao Preparado 2, acompanhada do desvio padrão respetivo

Banho Térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	Log UFC/g					
		30 °C/3 h	Média	Desvio - padrão	50 °C/3 h	Média	Desvio - padrão
80	0	4.641	2.593	1.027	-	-	-
	3	2.211			-		
	5	2.031			-		
	7	2.079			-		
	10	2.000			5.473		
90	0	-	-	-	-	-	-
	3	-			-		
	5	5.000			2.985		
	7	-			-		
	10	-			-		

**Tabela A3.** Média do logaritmo de UFC/g associada aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização correspondentes ao Preparado 3, acompanhada do desvio padrão respetivo

Banho Térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	Log UFC/g					
		30 °C/3 h	Média	Desvio - padrão	50 °C/3 h	Média	Desvio - padrão
80	0	2.325	2.147	0.107	4.413	2.996	0.713
	3	2.194			2.628		
	5	2.070			2.577		
	7	2.130			2.788		
	10	2.016			2.575		
85	0	3.141	2.915	0.196	3.139	2.774	0.512
	3	3.163			2.051		
	5	2.786			-		
	7	2.788			3.130		
	10	2.699			-		
90	0	2.101	2.161	0.114	-	-	-
	3	2.126			-		
	5	2.061			-		
	7	2.355			-		
	10	-			-		

**Tabela A4.** Média do logaritmo de UFC/g associada aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização correspondentes ao preparado 4, acompanhada do desvio padrão respetivo

Banho Térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	Log UFC/g					
		30 °C/3 h	Média	Desvio - padrão	50 °C/3 h	Média	Desvio - padrão
80	0	2.425	2.355	0.064	3.564	3.362	0.326
	3	2.252			3.759		
	5	2.411			2.981		
	7	2.371			2.968		
	10	2.317			3.540		
85	0	2.884	2.835	0.084	3.237	3.103	0.073
	3	2.810			3.084		
	5	2.974			3.014		
	7	2.753			3.085		
	10	2.754			3.094		

#### B – Carga microbiana associada aos binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização

Os dados descritos neste anexo dizem respeito aos cálculos intermédios realizados tendo em conta todos os valores obtidos após a contagem de colónias em placa.

Os valores apresentados nas tabelas seguintes foram obtidos realizando os mesmos cálculos que foram explicados no anexo A.

A partir destes dados foi possível gerar valores de  $D_T$  e  $z$  nos Preparados 1 e 2 que de outra forma não poderiam ser determinados e ainda foi possível complementar dados em falta nos Preparados 3 e 4.

**Tabela B1.** Carga microbiana do Preparado 1 calculado através da média do log UFC/g relativamente aos dois ensaios efetuados, acompanhada do desvio-padrão correspondente a cada um dos pontos

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	30 °C/3 h		50 °C/3 h	
		Média (log UFC/g)	Desvio-padrão	Média (log UFC/g)	Desvio-padrão
80	0	2.044	0.134	2.529	0,631
	3	3.251	0.161	3.948	1.381
	5	1.662	0.088	1.870	0.182
	7	1.486	0.088	1.725	0.071
	10	1.170	0.073	1.554	0.156
85	0	2.781	0.436	4.458	0.769
	3	1.976	0.331	2.940	0.111
	5	1.463	0.111	3.898	0.517
	7	1.503	0.293	3.808	0.966
	10	1.424	0.151	3.143	0.623
90	0	3.048	0.651	2.797	0.549
	3	2.538	0.472	3.690	0.838
	5	1.430	0.471	2.097	0.816
	7	2.074	0.023	1.835	0.739
	10	1.747	1.349	2.557	0.894

**Tabela B2.** Carga microbiana do Preparado 2 calculado através da média do log UFC/g relativamente aos dois ensaios efetuados, acompanhada do desvio-padrão correspondente a cada um dos pontos

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	30 °C/3 h		50 °C/3 h	
		Média (log UFC/g)	Desvio-padrão	Média (log UFC/g)	Desvio-padrão
80	0	4.248	1.584	1.777	0.514
	3	2.521	0.377	2.553	0.632
	5	2.261	0.229	3.214	0.259
	7	2.128	0.048	2.663	0.983
	10	2.113	0.203	1.074	0.023
85	0	1.674	0.652	2.653	0.934
	3	3.597	0.500	3.978	0.742
	5	4.287	0.412	3.369	1.503
	7	3.197	0.697	4.048	0.349
	10	2.986	0.588	0.986	0.588
90	0	1.335	0.761	0.398	0.000
	3	4.398	0.000	0.000	0.000
	5	4.438	0.562	2.985	0.483
	7	2.597	0.500	1.986	0.412
	10	2.197	1.512	1.597	0.500



**Tabela B3.** Carga microbiana do Preparado 3 calculado através da média do log UFC/g relativamente aos dois ensaios efetuados, acompanhada do desvio-padrão correspondente a cada um dos pontos

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	30 °C/3 h		50 °C/3 h	
		Média (log UFC/g)	Desvio-padrão	Média (log UFC/g)	Desvio-padrão
80	0	2.366	0.238	3.237	0.498
	3	2.178	0.061	3.545	0.951
	5	2.006	0.064	2.643	0.066
	7	2.093	0.032	2.788	0.282
	10	2.038	0.042	3.469	0.739
85	0	3.259	0.187	3.279	0.655
	3	3.444	0.306	2.875	0.724
	5	2.816	0.029	2.044	0.199
	7	2.824	0.036	2.488	0.643
	10	2.682	0.017	2.321	0.508
90	0	2.125	0.214	2.540	0.402
	3	2.557	0.510	1.989	0.011
	5	2.056	0.005	1.864	0.011
	7	2.246	0.108	1.862	0.017
	10	1.977	0.023	1.860	0.015

**Tabela B4.** Carga microbiana do Preparado 4 calculado através da média do log UFC/g relativamente aos dois ensaios efetuados, acompanhada do desvio-padrão correspondente a cada um dos pontos

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	30 °C/3 h		50 °C/3 h	
		Média (log UFC/g)	Desvio-padrão	Média (log UFC/g)	Desvio-padrão
80	0	2.355	0.080	3.564	0.549
	3	2.434	0.313	3.759	0.649
	5	2.270	0.130	2.981	0.056
	7	2.357	0.206	2.939	0.029
	10	2.378	0.061	3.540	0.570
85	0	2.787	0.151	3.247	0.213
	3	2.799	0.012	3.084	0.069
	5	2.974	0.072	3.014	0.046
	7	2.793	0.031	3.085	0.084
	10	2.832	0.078	3.094	0.052
90	0	1.743	0.044	1.595	0.021
	3	1.915	0.085	1.493	0.095
	5	1.199	0.199	1.273	0.000
	7	1.375	0.324	1.236	0.139
	10	1.296	0.199	1.000	0.000

## C – Valores do Teste *Anova* fator único

A análise estatística que se encontra nas Tabelas C1, C2, C3 e C4 diz respeito aos resultados estatísticos obtidos a partir dos dados do anexo A (valores dentro do limite de detecção da técnica) entre os binómios de ingredientação considerados. Desta forma, conseguiram-se determinar os valores estatisticamente significativos, tendo-se revelado significativos os valores do binómio de pasteurização 80 °C/10 min do Preparado 3 e binómios de pasteurização 80 °C/10 min e 85 °C/10 min do Preparado 4, uma vez que nesses casos  $p < 0.05$  e  $F > F_{\text{crítico}}$ .

**Tabela C1.** Resultados da análise estatística do teste "*Anova*: fator único" entre os binómios de ingredientação do preparado 1 para os valores dentro do limite de detecção da técnica

Binómio de pasteurização	$p$	F	$F_{\text{crítico}}$
80 °C/10 min <sup>2</sup>	-	65535	-
85 °C/10 min	0.234	2.846	18.513
90 °C/10 min	-	-	-

**Tabela C2.** Resultados da análise estatística do teste "*Anova*: fator único" entre os binómios de ingredientação do preparado 2 para os valores dentro do limite de detecção da técnica

Binómio de pasteurização	$p$	F	$F_{\text{crítico}}$
80 °C/10 min	0.084	5.245	7.709
85 °C/10 min	-	-	-
90 °C/10 min <sup>2</sup>	-	65535	-

---

<sup>2</sup>Trata-se apenas de um valor equacionado em cada binómio de ingredientação

**Tabela C3.** Resultados da análise estatística do teste "Anova: fator único" entre os binómios de ingredientação do preparado 3 para os valores dentro do limite de deteção da técnica

Binómio de pasteurização	$p$	F	$F_{\text{crítico}}$
80 °C/10 min	0.046	5.557	5.318
85 °C/10 min	0.647	0.232	5.987
90 °C/10 min	1	0	18.513

**Tabela C4.** Resultados da análise estatística do teste "Anova: fator único" entre os binómios de ingredientação do preparado 4 para os valores dentro do limite de deteção da técnica

Binómio de pasteurização	$P$	F	$F_{\text{crítico}}$
80 °C/10 min	$3.000 \times 10^{-4}$	36.819	5.318
85 °C/10 min	0.001	23.131	5.318
90 °C/10 min	-	-	-

Nesta análise estatística, Tabelas C5, C6, C7 e C8, os resultados estatísticos obtidos consideraram os dados no anexo B (valores fora do limite de deteção da técnica, ou seja menos de 300 colónias) entre os binómios de ingredientação considerados. Desta forma, conseguiram-se determinar os valores estatisticamente significativos, onde se revelaram significativos os valores do binómio de pasteurização de 85 °C/10 min do Preparado 1, do binómio de pasteurização 80 °C/10 min do Preparado 3 e dos binómios de pasteurização 80 °C/10 min e 85 °C/10 min do Preparado 4, uma vez que nesses casos  $p < 0.05$  e  $F > F_{\text{crítico}}$ .

**Tabela C5.** Resultados da análise estatística do teste "Anova: fator único" entre os binómios de ingredientação para todos os valores do preparado 1

Binómio de pasteurização	$p$	F	$F_{\text{crítico}}$
80 °C/10 min	0.498	0.503	5.318
85 °C/10 min	0.001	23.382	5.318
90 °C/10 min	0.350	0.986	5.318

**Tabela C6.** Resultados da análise estatística do teste "*Anova*: fator único" entre os binômios de ingredientação para todos os valores do preparado 2

Binómio de pasteurização	$p$	F	F <sub>crítico</sub>
80 °C/10 min	0.491	0.521	5.318
85 °C/10 min	0.847	0.040	5.318
90 °C/10 min	0.181	2.208	5.591

**Tabela C7.** Resultados da análise estatística do teste "*Anova*: fator único" entre os binômios de ingredientação para todos os valores do preparado 3

Binómio de pasteurização	$p$	F	F <sub>crítico</sub>
80 °C/10 min	$8.070 \times 10^{-4}$	27.202	5.318
85 °C/10 min	0.1611	2.385	5.318
90 °C/10 min	0.338	1.038	5.318

**Tabela C8.** Resultados da análise estatística do teste "*Anova*: fator único" entre os binômios de ingredientação para todos os valores do preparado 4

Binómio de pasteurização	$p$	F	F <sub>crítico</sub>
80 °C/10 min	$3.533 \times 10^{-4}$	35.058	5.318
85 °C/10 min	$8.744 \times 10^{-4}$	26.522	5.318
90 °C/10 min	0.312	1.163	5.318

## D – Determinação dos parâmetros cinéticos de morte térmica

Para a determinar o valor de  $D_T$  (Tabelas D1, D2, D3 e D4) foram elaborados vários gráficos (um para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização) no Excel onde no eixo YY foi considerado o logaritmo de UFC/g em função do tempo de pasteurização (eixo XX). Posteriormente, obtiveram-se as equações das retas, assim como as regressões lineares associadas, possibilitando o cálculo do valor de D através do inverso negativo do declive de cada reta.

No caso do cálculo do valor de z (Tabelas D5, D6, D7 e D8), tal como no valor de  $D_T$ , foram elaborados vários gráficos (um para cada binómio temperatura/tempo de ingredientação) onde no eixo YY foi considerado o logaritmo do valor de  $D_T$  em função da temperatura do banho (eixo XX). Desta forma obtiveram-se, igualmente, as equações das retas, assim como as regressões lineares associadas, proporcionando o cálculo do valor de z através do inverso do decliva de cada reta obtida.

Para calcular os parâmetros em cada preparado utilizaram-se os valores dos anexos A e B. Ou seja, para calcular os parâmetros cinéticos de morte térmica dos Preparados 1 e 2 utilizaram-se os valores do anexo B e para os dos Preparados 3 e 4 utilizaram-se os valores dos dois anexos.

- *D-value*

**Tabela D1.** Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de  $D_T$  para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 1, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	<i>D-value</i> (min)		
		Equação da reta	R <sup>2</sup>	D (min)
30 °C/3 h	80 °C/10 min	$y = -0.086x + 2.066$	0.993	11.6
	85 °C/10 min	$y = -0.133x + 2.588$	0.885	7.5
	90 °C/10 min	$y = -0.128x + 2.993$	0.989	7.8
50 °C/3 h	80 °C/10 min	$y = -0.099x + 2.466$	0.959	10.1
	85 °C/10 min	$y = -0.125x + 4.513$	0.947	8.0
	90 °C/10 min	$y = -0.138x + 2.795$	0.999	7.3

**Tabela D2.** Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de  $D_T$  para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 2, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	<i>D-value</i> (min)		
		Equação da reta	R <sup>2</sup>	D (min)
30 °C/3 h	80 °C/10 min	$y = -0.098x + 2.795$	0.966	10.2
	85 °C/10 min	$y = -0.245x + 5.288$	0.781	4.1
	90 °C/10 min	$y = -0.423x + 6.181$	0.795	2.4
50 °C/3 h	80 °C/10 min	$y = -0.436x + 5.515$	0.975	2.3
	85 °C/10 min	$y = -0.437x + 5.399$	0.992	2.3
	90 °C/10 min	$y = -0.266x + 4.139$	0.874	3.8

**Tabela D3.** Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de  $D_T$  para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 3, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	<i>D-value</i> (min)		
		Equação da reta	R <sup>2</sup>	D (min)
30 °C/3 h	80 °C/10 min	$y = -0.029x + 2.310$	0.967	34.7
	85 °C/10 min	$y = -0.051x + 3.170$	0.787	19.6
	90 °C/10 min	$y = -0.015x + 2.126$	1.000	67.6
50 °C/3 h	80 °C/10 min	$y = -0.153x + 3.761$	0.534	6.5
	85 °C/10 min	$y = -0.363x + 3.139$	1.000	2.8
	90 °C/10 min	$y = -0.072x + 2.508$	0.937	13.8

**Tabela D4.** Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de  $D_T$  para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 4, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	<i>D-value (min)</i>		
		Equação da reta	R <sup>2</sup>	D (min)
30 °C/3 h	80 °C/10 min	$y = -0.011x + 2.439$	0.844	94.3
	85 °C/10 min	$y = -0.013x + 2.866$	0.878	75.8
	90 °C/10 min	$y = -0.046x + 1.733$	0.983	21.7
50 °C/3 h	80 °C/10 min	$y = -0.095x + 3.540$	0.951	10.6
	85 °C/10 min	$y = -0.021x + 3.204$	0.674	48.8
	90 °C/10 min	$y = -0.060x + 1.620$	0.966	16.6

- *z-value*

**Tabela D5.** Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de  $z$  para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 1, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	<i>z-value (°C)</i>			
		Log D	Equação da reta	R <sup>2</sup>	z (°C)
30 °C/3 h	80 °C/10 min	1.063	$y = -0.017x + 2.398$	0.675	58.5
	85 °C/10 min	0.875			
	90 °C/10 min	0.892			
50 °C/3 h	80 °C/10 min	1.003	$y = -0.014x + 2.131$	0.952	70.4
	85 °C/10 min	0.904			
	90 °C/10 min	0.860			



**Tabela D6.** Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de z para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 2, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	z-value (°C)			
		Log D	Equação da reta	R <sup>2</sup>	z (°C)
30°C/3h	80°C/10 min	1.007	y = -0.063x + 6.053	0.979	15.8
	85°C/10 min	0.610			
	90°C/10 min	0.373			
50°C/3h	80°C/10 min	0.360	y = 0.022x - 1.395	0.747	-
	85°C/10 min	0.360			
	90°C/10 min	0.575			

**Tabela D7.** Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de z para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 3, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	z-value (°C)			
		Log D	Equação da reta	R <sup>2</sup>	z (°C)
30 °C/3 h	80 °C/10 min	<b>1.541<sup>3</sup></b>	y = -0.050x + 5.512	1.000	20.2
	85 °C/10 min	<b>1.292<sup>3</sup></b>			
	90 °C/10 min	1.830			
50 °C/3 h	80 °C/10 min	<b>0.816<sup>3</sup></b>	y = -0.075x + 6.816	1.000	13.3
	85 °C/10 min	<b>0.441<sup>3</sup></b>			
	90 °C/10 min	1.140			

<sup>3</sup> Nos valores assinalados apenas foram utilizados os pontos com valores de log D a negrito.

**Tabela D8.** Cálculos intermédios necessários à obtenção do valor de z para cada binómio temperatura/tempo de pasteurização do preparado 4, acompanhados das equações da retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	<i>z-value</i> (°C)			
		Log D	Equação da reta	R <sup>2</sup>	z (°C)
30 °C/3 h	80 °C/10 min	1.975	$y = -0.064x + 7.157$	0.859	15.7
	85 °C/10 min	1.879			
	90 °C/10 min	1.336			
50 °C/3 h	80 °C/10 min	1.024	$y = -0.093x + 9.629$	1	10.7
	85 °C/10 min	<b>1.688<sup>a</sup></b>			
	90 °C/10 min	<b>1.221<sup>a</sup></b>			

#### E – Efeitos dos fatores intrínsecos

Nesta secção apresentam-se os resultados complementares às conclusões obtidas no subcapítulo 4.2.2

**Tabela E1.** Valores de  $D_{80°C}$  e z obtidos para os preparados 1 e 2

	Binómio de ingredientação	<i>D-value</i> (min)		z (°C)
		80 °C		
Preparado 1	30 °C/3 h	11.6		58.5
	50 °C/3 h	10.1		70.4
Preparado 2	30 °C/3 h	10.2		15.8
	50 °C/3 h	2.3		-

**Tabela E2.** Valores de  $D_{80°C}$  e  $z$  obtidos para os preparados 2 e 4

	Binómio de ingredientação	<i>D-value</i> (min)		$z$ (°C)
		80 °C		
Preparado 2	30 °C/3 h	10.2		15.8
	50 °C/3 h	2.3		-
Preparado 4	30 °C/3 h	94.3		15.7
	50 °C/3 h <sup>1</sup>	10.6		10.7

F – Simulação dos binómios de pasteurização adequados à eliminação de *B.cereus*

**Tabela F1.** Simulação do binómio temperatura/tempo de pasteurização adequado à eliminação de *B.cereus* no preparado 1

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização
30 °C/3 h	100 °C/32 min
50 °C/3 h	100 °C/32 min

**Tabela F2.** Simulação do binómio temperatura/tempo de pasteurização adequado à eliminação de *B.cereus* no preparado 4

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização
30 °C/3 h	100 °C/30 min
50 °C/3 h	100 °C/ 12 min