

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Rosa Oliveira Aviz de Brito

Avaliação da termorresistência de fungos filamentosos resistentes em preparados de fruta, a partir da variação da temperatura e atividade da água

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

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

DECLARAÇÃO

Nome: Rosa Oliveira Aviz de Brito

Titulo da dissertação: Avaliação da termorresistência de fungos filamentosos termorresistentes em preparados de fruta, a partir da variação da T^a e a_w

Orientador: Professora Doutora Lúgia Raquel Marona Rodrigues

Orientador na empresa: Dr^a. Cristina Martins Rodrigues

Ano de conclusão: 2019

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:_____

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

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

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

Agradecimentos

Ao longo deste percurso académico que agora termina, tenho de agradecer a todas as pessoas que me acompanharam durante estes cinco anos e, em especial, àquelas que me ajudaram nesta caminhada e que tiveram especial impacto nos últimos meses durante o projeto que desenvolvi na FRULACT.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a toda a equipa do Centro de Investigação e Desenvolvimento da FRULACT, por toda o apoio e ajuda prestada durante estes últimos meses e, em especial, à Eng.^a Cândida Miranda por me ter dado a oportunidade de desenvolver o meu projeto nesta grande empresa.

À minha orientadora na FRULACT, a Dr.^a Cristina Rodrigues por toda a ajuda, apoio, partilha de conhecimentos e orientação durante o desenvolvimento deste projeto.

À minha orientadora na Universidade do Minho, a Professora Doutora Lúcia Rodrigues por toda a simpatia, orientação, disponibilidade, partilha de conhecimentos, apoio e interesse demonstrado.

Às minha colegas de estágio, Cátia Carvalho e Patrícia Faria, por toda a amizade, boa disposição, companheirismo e ajuda prestada nos momentos mais críticos. Sem elas esta experiência não teria sido tão gratificante.

À minha amiga Mariana Costa pelo carinho e bons momentos partilhados durante esta caminhada na vida académica.

Ao meu namorado, Filipe Gonçalves, por todo o apoio incondicional, companheirismo, carinho, paciência e amor demonstrados durante esta jornada conjunta na vida académica que tivemos oportunidade de partilhar.

E por fim, mas não menos importantes, aos meus pais e irmãos por todo o apoio demonstrado durante o meu percurso académico. Obrigada pelo esforço enorme que fizeram para me conseguirem proporcionar este caminho.

A todos o maior dos obrigados!

Resumo

A contaminação de alimentos por microrganismos termorresistentes revela-se uma grande preocupação para as empresas alimentares, devido à capacidade que estes organismos possuem de sobreviver aos processos de pasteurização normalmente aplicados, colocando em causa a qualidade alimentar do produto final e a segurança do consumidor. Neste sentido, o estudo do comportamento de fungos filamentosos termorresistentes, formadores de ascósporos, em preparados de fruta FRULACT revela-se de especial importância, uma vez que, estas estruturas têm a capacidade de sobreviver ao tratamento térmico aplicado, levando ao surgimento de fungos filamentosos à superfície dos preparados, bem como alterações das suas propriedades organolépticas. O objetivo desta dissertação foi avaliar o impacto de diferentes binómios tempo/temperatura de ingredientação e pasteurização na termorresistência de *Neosartorya fischeri*, quando o mesmo foi inoculado em três preparados de fruta - amora, framboesa e mirtilo - com diferentes condições de atividade da água (a_w). Para tal, foi necessário determinar os parâmetros cinéticos de morte térmica (D e z) para as diferentes condições estudadas. Os resultados obtidos para o preparado de amora mostram um incremento da termorresistência de *N. fischeri* com o aumento do tempo da etapa de ingredientação e a diminuição do a_w . Relativamente aos preparados de framboesa, foi possível observar que a diminuição da a_w e a diminuição do tempo de permanência na etapa de ingredientação potenciam a resistência térmica do fungo em estudo. Por último, verificou-se maior resistência de *N. fischeri* no preparado de mirtilo edulcorado em comparação com a referência açucarada, para o menor tempo da etapa de ingredientação.

Palavras-chave: ascósporos; *Neosartorya fischeri*; preparados de fruta; resistência térmica

Abstract

Food contamination by thermoresistant microorganisms is a major concern for the food industry because of their ability to survive the commonly applied pasteurization processes undermining the food quality of the final product and consumer safety. In this sense, the behaviour of heat-resistant fungi, forming of ascospores, in Frulact fruit preparations is of particular importance, since these structures have the ability to survive the heat treatment applied. This allows the emergence of filamentous fungi on the surface of the preparations, as well as changes in the organoleptic properties. The aim of this project was to analyse the impact of the different time/temperature binomials of ingredient and pasteurization on the resistance of *Neosartorya fischeri*, when it was inoculated in three fruit preparations - blackberry, raspberry and blueberry - with different conditions of water activity (a_w). In addition, it was necessary to determine the kinetic parameters of thermal death (D and z) for the different conditions studied. The results obtained for the blackberry preparation show an increase in *N. fischeri* heat resistance with increasing time of the ingredientation step and the decreasing of a_w . Regarding the raspberry preparations, it was observed that the decrease of a_w and the reduction of the residence time in the preparation stage potentiate the thermal resistance of the fungus under study. Finally, greater *N. fischeri* resistance was found in the higher water activity blueberry preparation compared to the lowest water activity reference for the shorter time of the ingredientation step.

Keywords: ascospores; *Neosartorya fischeri*; fruit preparations; thermoresistance

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Motivação e enquadramento do projeto	1
1.2. Apresentação da empresa	2
1.3. Objetivos.....	3
1.4. Organização da dissertação.....	4
Capítulo 2 - Revisão da literatura	5
2.1. Conceito geral de microbiologia alimentar	5
2.2. Segurança alimentar	5
2.3. Caracterização microbiológica das matrizes alimentares	6
2.3.1. Fungos filamentosos	6
2.3.2. Fungos filamentosos termorresistentes	8
2.3.3. <i>Neosartorya fischeri</i>	9
2.3.3.1. Identificação	9
2.3.3.2. Ecologia	10
2.3.3.3. Fisiologia	10
2.3.3.4. Toxicidade	10
2.4. Fatores que afetam a resistência térmica dos ascósporos.....	11
2.4.1. Influência do meio de aquecimento	11
2.4.1.1. pH.....	11
2.4.1.2. Atividade da Água - a_w	12
2.4.1.3. Sólidos solúveis	14
2.4.1.4. Presença de ácidos orgânicos	15
2.4.1.5. Adição de conservantes	15
2.4.2. Tempo e Temperatura de incubação	16
2.5. Controlo de microrganismos nos alimentos	16

2.5.1. Processamento térmico	16
2.5.2. Definição dos parâmetros de morte térmica	17
2.6. Preparados de fruta FRULACT	20
2.6.1. Processamento industrial.....	20
2.6.1.1. Receção das matérias-primas, armazenamento e transformação.....	21
2.6.1.2. Pesagem, ingredientação, pasteurização e embalamento	21
2.6.1.3. Composição nutricional	22
Capítulo 3 - Materiais e Métodos.....	23
3.1. Preparação dos meios de cultura	23
3.2. Procedimento experimental.....	23
3.2.1. Elaboração dos preparados de fruta	23
3.2.2. Obtenção do inóculo	24
3.2.3. Etapa de Ingredientação	26
3.2.4. Pasteurização	27
3.3. Análises microbiológicas	27
3.4. Análise estatística	28
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	29
4.1. Avaliação do impacto de diferentes binómios tempo/temperatura de ingredientação e pasteurização na carga microbiana dos preparados de bagas	29
4.2. Determinação dos parâmetros cinéticos de morte térmica	31
4.2.1. Preparado de amora.....	32
4.2.2. Preparado de framboesa.....	33
4.2.3. Preparado de mirtilo	35
4.3. Simulação dos binómios de pasteurização que melhor se adequam à eliminação de <i>N.</i> <i>fischeri</i>	36
Capítulo 5 - Conclusões finais e Recomendações	38
Bibliografia.....	40

A - Carga microbiana associada aos binómios tempo/temperatura de ingredientação e pasteurização	43
B - Determinação dos parâmetros de morte térmica	47
C - Valores do teste ANOVA Fator Único	51

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida generalizado dos fungos filamentosos (retirado de [3]).	7
Figura 2. Cultura de <i>Neosartorya fischeri</i> em PDA.	9
Figura 3. Relação entre a população de microrganismos viáveis em valor absoluto e o tempo, a temperatura constante (retirado de [33]).	18
Figura 4. Relação entre o valor D e a temperatura para determinar o valor z (retirado de [34]).	19
Figura 5. Esquema das etapas de processamento industrial, desde a receção das matérias-primas até à expedição do produto final.	21
Figura 6. a) Garrafa inclinada com meio PDA utilizada no crescimento e maturação da cultura de <i>N. fischeri</i> ; b) Interior da garrafa onde é possível a observação da massa micelial com 5 semanas de incubação a 25°C; c) Sistema de filtração a vácuo utilizado para a recolha do inóculo.	25
Figura 7. Esquema representativo da fase de ingredientação dos preparados de fruta.	26
Figura 8. Esquema representativo da fase de pasteurização dos preparados de fruta.	27
Figura 9. Carga microbiana obtida em cada um dos binómios às diferentes temperaturas de pasteurização aplicadas.	30

Lista de tabelas

Tabela 1. Resistência térmica de ascósporos a diferentes temperaturas e meios de aquecimento (adaptado de [36,37])	20
Tabela 2. Composição nutricional da amora, framboesa e mirtilo (adaptado de [38])	22
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos associados aos diferentes preparados de bagas.....	24
Tabela 4. Valores D e z obtidos para os diferentes preparados de bagas, nos binômios tempo/temperatura de ingredientação estudados	31
Tabela 5. Valores de D e z para o preparado de amora açucarado e edulcorado.....	32
Tabela 6. Valores de D e z obtidos para o preparado de framboesa açucarado e edulcorado .	33
Tabela 7. Valores de D e z obtidos para o preparado de mirtilo açucarado e edulcorado	35
Tabela 8. Simulação dos binômios tempo/temperatura de pasteurização adequados à eliminação de <i>N. fischeri</i> nos preparados de fruta	37
Tabela A1. Carga microbiana do preparado de amora açucarado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binômios de ingredientação, ao longo dos binômios de pasteurização aplicados	43
Tabela A2. Carga microbiana do preparado de amora edulcorado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binômios de ingredientação, ao longo dos binômios de pasteurização aplicados.....	44
Tabela A3. Carga microbiana do preparado de framboesa açucarado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binômios de ingredientação, ao longo dos binômios de pasteurização aplicados.....	44
Tabela A4. Carga microbiana do preparado de framboesa edulcorado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binômios de ingredientação, ao longo dos binômios de pasteurização aplicados	45
Tabela A5. Carga microbiana do preparado de mirtilo açucarado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binômios de ingredientação, ao longo dos binômios de pasteurização aplicados	45
Tabela A6. Carga microbiana do preparado de mirtilo edulcorado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binômios de ingredientação, ao longo dos binômios de pasteurização aplicados	46

Tabela B1. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de amora açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	47
Tabela B2. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de amora edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	48
Tabela B3. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de framboesa açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	48
Tabela B4. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de framboesa edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	48
Tabela B5. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de mirtilo açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	49
Tabela B6. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de mirtilo edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	49
Tabela B7. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de amora açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	49
Tabela B8. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de amora edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	50
Tabela B9. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de framboesa açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	50
Tabela B10. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de framboesa edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	50

Tabela B11. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de mirtilo açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	51
Tabela B12. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de mirtilo edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes	51
Tabela C1. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binómios de ingredientação do preparado de amora açucarado	52
Tabela C2. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binómios de ingredientação do preparado de amora edulcorado	52
Tabela C3. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binómios de ingredientação do preparado de framboesa açucarado.....	52
Tabela C4. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binómios de ingredientação do preparado de framboesa edulcorado.....	53
Tabela C5. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binómios de ingredientação do preparado de mirtilo açucarado	53
Tabela C6. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binómios de ingredientação do preparado de mirtilo edulcorado	53

Lista de siglas e abreviaturas

<i>a_w</i>	Atividade da água
<i>°Brix</i>	Grau Brix (escala de medida da quantidade de açúcares)
BPW	<i>Buffered Peptone Water</i>
CYA	<i>Czapek Yeast Extract Agar</i>
D	Tempo necessário para ocorrer a redução de um ciclo logarítmico (minutos)
DG-18	<i>Dichloran Glycerol Chloramphenicol</i>
DRBC	<i>Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar</i>
HRM	Heat - resistant molds
M'P	Matéria - prima
PDA	<i>Plate Dextrose Agar</i>
pH	Potencial de Hidrogénio
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
z	Intervalo de temperatura necessário para alterar valor D um ciclo logarítmico (°C)

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Motivação e enquadramento do projeto

O conceito de segurança alimentar constitui uma das principais preocupações da população mundial, estando largamente relacionado com a saúde humana. É neste sentido que cada vez mais as empresas, tais como a FRULACT, procuram metodologias que permitam garantir a satisfação das necessidades do consumidor, bem como a segurança alimentar e qualidade dos produtos por si comercializados.

Neste contexto, os tratamentos térmicos, tal como a pasteurização e a esterilização, assumem especial relevância na medida em que possibilitam a inativação microbiana presente no produto final, como por exemplo os preparados FRULACT. Deste modo, as etapas de controlo da carga microbiana resume-se: (1) a receção, transformação e armazenamento de matérias-primas; (2) a ingredientação, destinada à formulação de cada preparado, obedecendo ao binómio tempo/temperatura definido; (3) o cumprimento dos parâmetros associados ao tratamento térmico a que o produto é submetido em cada linha de produção; e (4) o correto embalamento dos produtos acabados, devem ser criteriosamente avaliados de forma a controlar eventuais perigos que possam comprometer a segurança dos produtos e, conseqüentemente, a saúde dos consumidores.

No entanto, existem determinados microrganismos como os fungos filamentosos e bactérias formadores de esporos que possuem a capacidade de sobreviver aos processos de pasteurização comumente aplicados nas indústrias alimentares, pela elevada resistência que os seus esporos apresentam a condições térmicas e físico-químicas adversas, como pH ácido e baixa atividade da água (a_w).

Neste sentido, o presente projeto de dissertação visa estudar o comportamento dos esporos termorresistentes do fungo filamentoso *Neosartorya fischeri* quando inoculados em preparados de bagas FRULACT - amora, framboesa e mirtilo - com baixos e elevados valores de a_w , e quando submetidos a diferentes binómios tempo/temperatura de ingredientação e pasteurização, de forma a avaliar a influência destes no aumento ou diminuição da resistência térmica.

1.2. Apresentação da empresa

O presente projeto de dissertação foi realizado em parceria com a Universidade do Minho e a empresa FRULACT - Ingredientes para a Indústria Alimentar, S.A.

Fundada em setembro de 1987 pelo Comendador Arménio Pinheiro Miranda e pelos seus dois filhos, João Miranda e Francisco Miranda, no quintal da sua moradia em Leça, a FRULACT posiciona-se como uma empresa inovadora no fornecimento de ingredientes de valor acrescentado para as indústrias alimentares e de bebidas, desenvolvendo preparados à base de frutas para os laticínios, gelados, sobremesas, bebidas e alternativas vegetais.

O rápido sucesso desta empresa levou ao seu crescimento, quer em termos de dimensão, quer de visão, pelo que, em 1992 decidiram investir na construção de uma unidade industrial na Maia. Pouco tempo depois, em 1998, a empresa continuou a sua expansão em território nacional com a compra da desativada unidade de transformação de fruta da Cooperativa de Fruticultores da Cova da Beira, em Ferro, Covilhã. Em 1999, a FRULACT apostou na sua internacionalização chegando a Marrocos. Em 2006, o Grupo adquire uma nova dimensão com a abertura da fábrica de Tortosendo, na Covilhã, equipada com tecnologia industrial de ponta, juntamente com a expansão para França, com a aquisição da empresa francesa Granger Bouguet Pau. No ano 2009, a FRULACT volta a intensificar a sua presença no mercado francês com a aquisição da divisão GR6, pertencente ao grupo Kerry, uma unidade fabril localizada no sudeste de França. O ano de 2011 foi de aposta na inovação com a inauguração do FRUTECH - Centro de Investigação, Desenvolvimento e Inovação da FRULACT, na Maia. Este investimento constitui um marco importante para a empresa, contribuindo para alavancar a inovação e o conhecimento, elementos essenciais para criar ingredientes de valor acrescentado e, consequentemente, fomentar a sustentabilidade. O ano seguinte foi marcado pela expansão do grupo para África de Sul, com a construção de uma unidade fabril em Pretória, reforçando e alargando a sua presença no continente africano. Em 2017, a FRULACT avança para o outro lado do oceano atlântico, com a inauguração de uma nova unidade industrial localizada em Kingston, no Canadá. A entrada na região da América do Norte significou a expansão da presença internacional desta empresa para três continentes e representa um significativo desenvolvimento rumo às suas ambições de presença global.

O processo de internalização e crescimento da FRULACT só foi e continua a ser possível devido a uma aposta clara e séria na produção de conhecimento, capaz de suportar as atividades de Inovação e Desenvolvimento (IDI), acompanhado sempre por um investimento em quantidade e qualidade dos

recursos estruturais fundamentais, nomeadamente instalações industriais, tecnologias modernas, processos baseados nas melhores práticas e recursos humanos competentes e qualificados.

A elevada segurança e qualidade dos produtos FRULACT faz com que esta sirva diretamente grandes clientes e marcas mundiais e locais, tais como DANONE, NESTLÉ, YOPLAIT, SENOBLE, PASCUAL, LACTALIS-PRESIDENT, NOVANDIE, EMMI, IPARLAT, LACTOGAL, UNILEVER, entre outros. Adicionalmente, a FRULACT também foi dando os primeiros passos com as suas próprias marcas Fru, Fru - Fruits For You e Benefit.

O sucesso da FRULACT é o reflexo dos vários prémios e distinções que tem adquirido ao longo dos últimos anos, tais como o Prémio Inovação 2003 (Ministério da Agricultura e Pesca); Prémio PME Inovação 2007 (COTEC Portugal e BPI); Prémio Inovação e Tecnologia 2008 (IAPMEI) e Prémio Empreendedor do Ano Ernst & Young 2008 (Menção Honrosa); considerada Empresa Europeia do Ano 2011 pela European Business Awards; Líder do Ano 2012 nas Novas Tecnologias pela Best Leader Awards; em 2013 foi a primeira empresa a receber o Prémio Excellens Oeconomia pelo Jornal de Negócios e PwC e, em 2018, recebe o Prémio Exportação e Internacionalização do sector Agro-alimentar.

Em 2020, a FRULACT ambiciona ser reconhecida como a empresa mais inovadora do mercado nacional, expandir as operações à escala global e conseguir posicionar-se no Top 3 das maiores empresas do sector.

1.3. Objetivos

O objetivo global deste projeto de dissertação foi o estudo do comportamento microbiano do fungo *M. fisheri* em preparados de fruta quando expostos a diferentes binómios tempo/temperatura de ingredientação e pasteurização, bem como condições distintas de atividade da água. Nesse sentido, definiram-se um conjunto de objetivos secundários que se encontram abaixo resumidos:

(1) Elaboração de preparados de bagas - amora, framboesa e mirtilo - com diferentes características e inoculação dos mesmos com os ascósporos do fungo, para estudos da termoresistência;

(2) Avaliação do impacto de diferentes binómios tempo/temperatura na etapa de ingredientação - aplicados de acordo com os dados verificados em fábrica - no comportamento da carga microbiana, nomeadamente no aumento ou diminuição da resistência térmica do microrganismo em questão;

(3) Estudo do comportamento do microrganismo-alvo durante a aplicação de diferentes binómios tempo/temperatura de pasteurização;

(4) Determinação dos parâmetros de cinética de inativação térmica (D e z);

(5) Seleção do(s) binómio(s) tempo/temperatura de pasteurização adequado(s) à inativação de *N. fischeri* no presente projeto;

1.4. Organização da dissertação

A presente dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos:

- o capítulo 1 é constituído pela introdução, onde consta a motivação e enquadramento do projeto, a apresentação da empresa onde foi realizado o estágio e os objetivos do projeto de dissertação;
- o capítulo 2 é composto pelo estado de arte, onde são abordados os fundamentos teóricos do projeto necessários para a correta interpretação do tema, fazendo referência a investigações e dados obtidos anteriormente, constituindo a apoio científico para o projeto desenvolvido;
- no capítulo 3 encontra-se a descrição dos métodos e procedimentos utilizados ao longo do trabalho experimental;
- no capítulo 4 são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no presente projeto;
- por fim, no capítulo 5 encontram-se as conclusões do trabalho, bem como recomendações para futuros projetos.

Capítulo 2 - Revisão da literatura

2.1. Conceito geral de microbiologia alimentar

A microbiologia é a área da ciência que se dedica ao estudo dos microrganismos que são invisíveis a olho nu. Microbiologia define-se como Mikros (ou seja, pequeno) mais Bio (ou seja, vida) mais logos (ou seja, ciência).

Com base neste conceito, a microbiologia aborda um vasto e diverso grupo de organismos unicelulares de reduzidas dimensões, que podem ser encontrados como células isoladas ou agrupados em diferentes arranjos. Deste modo, a microbiologia envolve o estudo de organismos procariontes (bactérias, cianobactérias e arqueobactérias), eucariontes (algas, protozoários e fungos) e também seres acelulares (vírus).

A microbiologia dos alimentos estuda os processos em que os microrganismos influenciam as características dos produtos alimentares. Na verdade, os microrganismos são fundamentais na obtenção de alguns produtos alimentares como, por exemplo, os alimentos fermentados, mas são também os principais responsáveis pela deterioração de grande parte dos alimentos e culturas, sendo portanto os principais responsáveis por surtos de doenças gastrointestinais.

2.2. Segurança alimentar

Todos os anos, milhões de pessoas em todo o mundo morrem e muitas são hospitalizadas por doenças transmitidas pela ingestão alimentar, como resultado do consumo de alimentos contaminados. A ocorrência destas doenças é particularmente problemática nos países em desenvolvimento, embora os incidentes ocorram também nos países mais ricos e desenvolvidos. A segurança alimentar torna-se, assim, um dos problemas mais importantes de saúde pública em todo o mundo.

O conceito de segurança alimentar, segundo o *Codex Alimentarius*, surge como a “garantia de que o alimento não causará danos no consumidor quando preparado e/ou consumido de acordo com o uso a que se destina”, o qual pode ser conseguido através da aplicação de boas práticas e requisitos normativos impostos ao fabrico, manipulação, conservação e transporte de qualquer produto destinado ao consumo alimentar.

No entanto, podem ocorrer contaminações de natureza química, física e biológica durante as diferentes fases/etapas da cadeia alimentar. As empresas do setor alimentar (desde a produção primária

à distribuição, passando pela transformação) têm assim o grande desafio de demonstrar aos seus clientes as suas capacidades para identificar e controlar os riscos relacionados com a segurança alimentar, bem como as condições ideais para controlar e prevenir os potenciais impactos dos bens de consumo. Deste modo, torna-se fundamental a implementação de sistemas de controlo da segurança alimentar como o *Hazard Analysis and Critical Control Point* (HACCP) por parte das mesmas. Este sistema baseia-se numa metodologia preventiva, através da aplicação de princípios técnicos e científicos aplicados na produção e manipulação dos géneros alimentícios, com o objetivo de evitar possíveis riscos através da eliminação ou redução de perigos que possam causar danos aos consumidores, evitando assim, a distribuição de alimentos não seguros.

A aposta na promoção e garantia da segurança alimentar dos seus produtos é, hoje em dia, uma exigência para garantir a confiança dos seus clientes, de forma a conseguirem posicionar-se num mercado cada vez exigente, de forma credível e socialmente responsável [1].

2.3. Caracterização microbiológica das matrizes alimentares

2.3.1. Fungos filamentosos

Os fungos pertencem ao reino Fungi e encontram-se amplamente distribuídos no meio ambiente, incluindo o ar, água e solo. Na indústria alimentar, a sua presença na matéria-prima origina sérios problemas relacionados com a deterioração de produtos de fruta, vegetais e cereais, que se caracteriza pela aparência indesejável, redução na qualidade e textura dos mesmos, desenvolvimento de *off-flavour* e perda de nutrientes. Devido aos elevados teores em açúcares e baixos valores de pH que as frutas apresentam, estas tornam-se particularmente desejáveis à deterioração fúngica [2].

Este Reino é composto por leveduras, organismos unicelulares, e por fungos filamentosos, organismos multicelulares, que obtêm nutrientes por absorção de compostos orgânicos. Os fungos filamentosos são constituídos por filamentos de células foliformes, longas e ramificadas, denominadas de hifas, que formam massas visíveis a olho nu chamadas de micélio. Quando atingem a fase de maturação, as hifas formam pequenas esferas, geralmente escuras e visíveis. Estas esferas são constituídas por centenas de esporos que, após rutura da membrana, ficam dispersos no ar e, conseqüentemente, depositam-se em novas matrizes alimentares. Dependendo das espécies, os esporos podem ser formados por reprodução sexuada ou assexuada. Os esporos assexuais são geneticamente idênticos à célula-mãe, enquanto que, os esporos sexuais resultam da fusão de núcleos de duas

linhagens opostas do cruzamento de uma mesma espécie do fungo. Na figura 1 encontra-se esquematizado o ciclo de vida dos fungos filamentosos, onde estão representadas as reproduções, assexuada e sexuada.

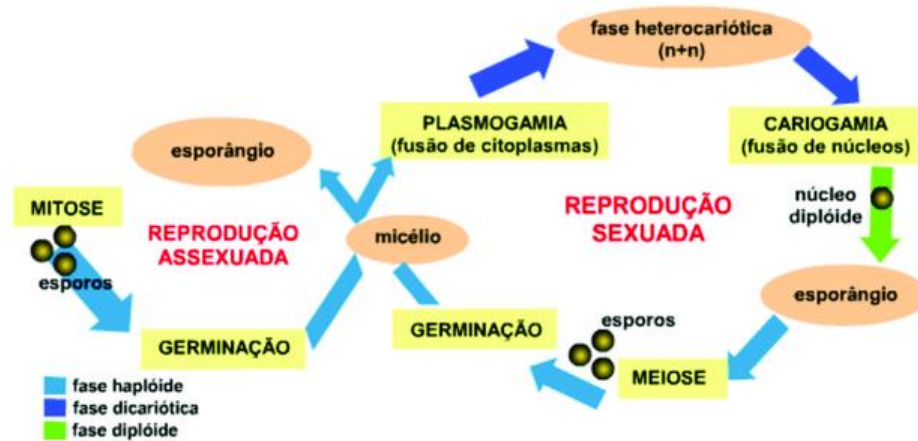


Figura 1. Ciclo de vida generalizado dos fungos filamentosos (retirado de [3]).

Dependendo dos níveis de humidade disponível, os esporos germinam e formam novos micélio. Quando se encontram metabolicamente ativos, os esporos em germinação têm a capacidade de libertar metabolitos secundários, as micotoxinas, responsáveis pelo aparecimento de doenças cancerígenas e mutações genéticas [4]. Os esporos fúngicos são geralmente de tamanho microscópico, podendo variar entre 3 e 30 μm , dependendo da espécie. Apresentam também uma enorme variedade na sua forma, pigmentação, ornamentação e resistência a diferentes condições de *stress*, como elevadas pressões e temperaturas [5].

As diferenças de morfologia observadas entre as diferentes espécies permitem a identificação de fungos filamentosos por taxonomia clássica, onde se utilizam características morfológicas macroscópicas (diâmetro da colônia, cor e textura, aspeto da borda, rugosidade e presença de pigmentos solúveis), microscópicas (forma e cor da hifa, presença ou ausência de septos, tipo e arranjo de esporos, entre outros) e, ainda, por análise da velocidade de crescimento. No entanto, este torna-se um processo demorado e pouco fiável, uma vez que a descrição e perceção das características observadas podem diferir de pessoa para pessoa. Assim, atualmente, recorre-se a técnicas de identificação por biologia molecular, onde se procede à extração do DNA a partir do rompimento da parede celular e de membranas para, posteriormente, se proceder à amplificação e identificação da sua sequência, pela técnica de PCR [6].

2.3.2. Fungos filamentosos termorresistentes

A maioria dos fungos filamentosos apresenta limitada resistência térmica, sendo facilmente destruídos pela aplicação de processamentos térmicos. É o que se sucede com os fungos do género *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, entre outros, que são facilmente inativados por processos normais de pasteurização, como aquecimento a 70°C durante 10 minutos [7].

No entanto, existem fungos que têm a capacidade de sobreviver às temperaturas aplicadas durante os processos de pasteurização de alimentos ácidos, como os preparados de fruta e seus derivados, causando numerosos incidentes de deterioração e perdas económicas significativas, pois podem crescer e contaminar o produto durante o seu armazenamento à temperatura ambiente. Estes fungos são denominados por fungos filamentosos termorresistentes (HRM - *Heat - Resistant Molds*), onde, se destacam os géneros *Neosartorya* sp., *Byssochlamys* sp., *Talaromyces* sp. e *Eupenicillium* sp.. De entre as espécies termorresistentes frequentemente isoladas em produtos de fruta termicamente processados destaca-se *Neosartorya fischeri*, *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Talaromyces flavus* e *Eupenicillium* sp. [8]. O ciclo de vida destes fungos é composto por uma fase assexual, que produz esporos não resistentes ao calor denominados de conídios e, por uma fase sexual, que produz esporos resistentes ao calor, designados por ascósporos.

Como referido anteriormente, a capacidade de sobrevivência destes fungos aos processamentos térmicos aplicados na indústria está relacionada com a formação de ascósporos muito resistentes ao calor. O tamanho, forma e ornamentação dos ascósporos varia com o tipo, espécie e linhagem do microrganismo, bem como, as condições do meio sob os quais os esporos são formados. A principal característica destes fungos é a produção de um asco, estrutura em forma de saco ou bolsa, no interior da qual são produzidos oito ascósporos de forma e cor variados para cada espécie. Quando amadurecem, os ascos sofrem uma rutura por onde são libertados os ascósporos. No entanto, estes esporos podem permanecer em estado de dormência, nos restos de frutas apodrecidas ou do contacto das mesmas com o solo, precisando por vezes de uma ativação térmica para germinarem. Assim, a pasteurização normalmente aplicada aos produtos de fruta ativa os ascósporos dormentes, que germinam e permitem o crescimento de fungos termorresistentes capazes de provocarem alterações no produto como escurecimento, separação de fases, diminuição da viscosidade devido à excreção de enzimas pectinolíticas e mau cheiro [4].

2.3.3. *Neosartorya fischeri*

Os fungos termorresistentes estão normalmente associados à deterioração de produtos de fruta pasteurizados. De entre todos os fungos termorresistentes capazes de sobreviverem aos tratamentos de pasteurização comumente aplicados a produtos de fruta ácidos ($\text{pH} < 4.6$) como sumos, purés, geleias e compotas, destaca-se o *Neosartorya fischeri* (estado anamorfo: *Aspergillus fischeri*). Este fungo pertence ao filo Ascomycota e caracteriza-se por produzir ascósporos de diferentes morfologias em grupos de oito, no interior de um asco fechado e esférico, designado por cleistotécio. Atualmente, são conhecidas cerca de 10 espécies e variedades deste fungo, todos termófilos, nenhum xerófilo [9].

As culturas deste fungo apresentam elevada relevância para a indústria alimentar, uma vez que, juntamente com outros ascomicetes produtores de ascósporos como *Byssoschlamys nivea* e *Talaromyces flavus*, constituem a principal causa de deterioração de produtos de fruta termicamente processados. Os ascósporos destes fungos, além da elevada termorresistência que possuem têm, ainda, a capacidade de produzir várias enzimas pectinolíticas, capazes de provocar a desintegração destes produtos [9].

2.3.3.1. Identificação

As colónias de *Neosartorya fischeri* crescem rapidamente entre os 25 e 37°C, podendo atingir, aproximadamente, 50 - 60 mm de diâmetro (Figura 2). Apresentam uma superfície densa, textura rugosa e micélio branco a amarelo pálido, com desenvolvimento abundante de cleistotécio (150 - 400µm). Quando esta estrutura atinge o estado de maturação ocorre a rutura do asco e dá-se a libertação dos ascósporos do seu interior (8 - 13µm). Quando observadas ao microscópio, as paredes dos ascósporos podem apresentar-se lisas ou rugosas. Estas estruturas são capazes de crescer e germinar numa gama ampla de temperaturas, compreendidas entre os 10 e 52°C, valores de pH entre 3 e 8, e, sob baixas pressões parciais de oxigénio [8,9].



Figura 2. Cultura de *Neosartorya fischeri* em PDA.

2.3.3.2. Ecologia

A deterioração de fruta e produtos à base de fruta por *Neosartorya fischeri*, após serem submetidos a processamento térmico, não é um problema recente. De facto, em 1963, este fungo foi isolado a partir de polpas de morango enlatadas, após se proceder à sua abertura e incubação a 25°C durante 5 dias. Este estudo, evidenciava assim o potencial problema que esta espécie originava a alimentos ácidos enlatados. De igual forma, McEvory and Stuart observaram que *N. fischeri* foi a causa da deterioração de morangos enlatados na Irlanda entre 1958 e 1968, após se proceder ao aumento no comprimento e severidade do processo de enlatamento utilizado [10].

No entanto, a deterioração de alimentos por *N. fischeri* não se restringia apenas a produtos enlatados. Em diversos estudos, foram identificadas e isoladas colónias deste fungo em fruta fresca termicamente processada, sumos de fruta pasteurizados e, ainda, em pós de fruta. Contudo, esta espécie foi raramente identificada e isolada em produtos não tratados ou processados termicamente [9].

2.3.3.3. Fisiologia

Os ascósporos de *N. fischeri*, juntamente com os do género *Byssochlamys* sp., são considerados os esporos fúngicos mais resistentes ao calor conhecidos, podendo sobreviver e germinar após aquecimento em água destilada a 100°C durante 60 minutos. Em 1970, também McEvory e Stuart estudaram a termorresistência desta espécie em água destilada: depois de submetidos durante 20 minutos a 80°C todos os ascósporos ainda se encontravam viáveis e, após 5 minutos a 100°C apenas 0.002% sobreviveram. Noutro estudo, Splittstoesser e Splittstoesser, observaram uma resistência térmica semelhante entre os ascósporos de *N. fischeri* e *B. fulva*, onde, após aquecimento a 85°C durante 60 minutos, em sumo de uva (5 °Brix e pH 3.5), apenas 14% da população ainda se encontrava viável [11].

2.3.3.4. Toxicidade

Certas variedades de *N. fischeri* têm a capacidade de produzir toxinas como Fumitromogin do tipo A, B e C e Venuculogen, que, ao atuarem no sistema nervoso central causam tremores e convulsões.

A produção destas micotoxinas encontra-se relacionada com diversos fatores, como a idade da cultura, a temperatura de incubação e as características do substrato. Por exemplo, Nielsen *et al.* estudaram a produção de Fumitromogin por *N. fischeri* no meio de cultura CYA por 74 dias. Após

submeterem o micélio do fungo, assim como o meio de cultura utilizado para o crescimento do mesmo a análise em cromatografia líquida, os resultados mostraram presença de Fumitromorgin A e C e Venuculogen. Estes autores observaram ainda que as temperaturas ótimas para a produção destas micotoxinas eram 25, 30 e 37°C, respectivamente. Por fim, ao estudarem a influência da presença de diferentes açúcares, os autores observaram que a adição de glucose, sacarose e frutose ao meio de cultura originou uma maior produção destas toxinas [12].

2.4. Fatores que afetam a resistência térmica dos ascósporos

O tratamento térmico a que um produto é sujeito deve ser adequado para a inativação da maioria dos fungos termorresistentes, sem, contudo, diminuir a qualidade do produto processado. Caso isto não seja possível, medidas alternativas, com a finalidade de prevenir o desenvolvimento destes microrganismos e a deterioração provocada pelos mesmos, devem ser aplicadas. Algumas dessas alternativas passam pela manipulação de fatores intrínsecos à matriz alimentar, através de alterações de parâmetros como o pH, a_w , teor de sólidos solúveis, presença de ácidos orgânicos e adição de conservantes. No entanto, existem fatores externos às matrizes alimentares que também influenciam a resistência térmica destes microrganismos, como é o caso do tempo e temperatura de incubação. É de salientar que, é a combinação dos diversos fatores que leva a uma maior ou menor termoressistência e que nem sempre é possível comparar resultados obtidos usando diferentes matrizes ou condições de processamento.

2.4.1. Influência do meio de aquecimento

2.4.1.1. pH

Todos os microrganismos apresentam um valor de pH mínimo, ótimo e máximo para o seu crescimento, sobrevivência e atividade enzimática. Está bem estabelecido que a maioria dos microrganismos cresce em valores de pH neutros, compreendidos entre 6.6 e 7.5 e que poucos têm a capacidade de crescer em valores de pH abaixo de 4. As bactérias tendem a ser mais sensíveis às variações de pH do que os fungos filamentosos e leveduras, sendo que as bactérias patogênicas apresentam ainda maior sensibilidade, crescendo numa gama de pH bastante restrita [13].

Os valores mínimos e máximos de pH tolerados para cada microrganismo são muito influenciados pela composição do próprio alimento. Por exemplo, o pH mínimo para o crescimento de certas bactérias lácticas depende do tipo de ácido utilizado, sendo que, são precisas menores concentrações de ácido acético e ácido lático para inibição do crescimento microbiano, comparativamente à utilização de ácido cítrico, tartárico, fosfórico e clorídrico, onde é necessária uma maior concentração [14].

Além de desempenhar um papel importante na estabilidade microbiana, o pH também tem grande importância na definição da intensidade do processamento térmico utilizado em produtos de fruta ácidos, uma vez que, este tipo de produto é mais suscetível a deterioração por fungos filamentosos termorresistentes [15].

De acordo com Tournas, a faixa de pH em que os fungos termorresistentes podem crescer e proliferar, num determinado meio de cultura, apresenta-se bastante ampla. Como exemplo, este autor cita *N. fischeri*, capaz de crescer numa faixa de pH compreendida entre 3.0 a 7.95, e *Byssochamys* sp., capaz de crescer em substratos com valores de pH entre 2.0 a 9.0. Este autor menciona ainda que a correção do pH do meio de cultura inviabiliza a inibição do crescimento destes fungos [16]. No entanto, Conner e Beuchat demonstraram que a resistência térmica de *N. fischeri* aumenta com o aumento do pH do meio de aquecimento para valores acima de 6.0 e, que para valores de pH compreendidos entre 3.5 a 5.5 isto não se verifica [17].

King *et al.* realizaram ensaios de resistência térmica em *T. flavus* utilizando meios sintéticos de aquecimento (glucose 16 °Brix/ácido tartárico 0,033 M) ajustados a pH 3.6, 5.0 e 6.6. Neste estudo, foi observado um aumento da resistência térmica com o aumento do pH do meio de aquecimento [18].

O estudo do efeito do pH do meio de aquecimento na percentagem de germinação de *B. nivea* foi alvo de estudo no trabalho realizado por Yates *et al.*, onde, os esporos do fungo foram suspensos em meios ajustados a pH variando de 3.0 a 5.5. Após ter sido aplicado um choque térmico de 75°C durante 5 minutos, verificou-se uma maior germinação na faixa de pH compreendida entre 4.0 e 4.5, porém, a partir de pH 5.0 a percentagem de germinação começou a diminuir [19]

2.4.1.2. Atividade da Água - a_w

A atividade da água (a_w) é a quantidade de água disponível para o crescimento microbiano e outras funções biológicas como reações enzimáticas e químicas. Esta não deve ser confundida com a humidade do alimento, uma vez que a água disponível ou livre depende das interações com os componentes do alimento, não apresentando uma relação direta com a humidade do produto.

Tal como o pH, todos os microrganismos apresentam uma gama a_w dentro da qual crescem e se reproduzem, sendo que, abaixo do limite inferior dessa faixa estes perdem a capacidade de germinar e crescer, impedindo a deterioração do alimento. Assim, por vezes, surge a necessidade de diminuir a_w do produto para aumentar o tempo de prateleira do mesmo. Ao diminuir a a_w para um valor abaixo do valor ótimo, está-se a aumentar a fase latência e a reduzir a taxa de crescimento, o que originará *stress* osmótico [14]. A redução da a_w dos produtos alimentares pode ser conseguida por diversos mecanismos como a secagem, desidratação a frio e a vácuo pelo processo de liofilização, e, pela adição de solutos como sal ou açúcar. Deste modo, alimentos com alta a_w , como os produtos frescos, têm tendência para se deteriorarem mais rapidamente que aqueles com baixo conteúdo de água disponível, devido à rápida multiplicação de bactérias. Os fungos filamentosos e leveduras apresentam um intervalo de a_w ótimo para o seu desenvolvimento compreendido entre 0.60 a 0.91.

Após a realização dos processos de pasteurização a produtos com elevada a_w , estes devem ser armazenados a baixas temperaturas de forma a que não ocorra a germinação dos ascósporos sobreviventes. Assim, a diminuição simultânea da temperatura de armazenamento e da a_w é fundamental para a conservação de alimentos termoprocessados.

A influência da a_w no crescimento de *Neosartorya* sp., em sumos de fruta (agar sumo de manga, agar sumo de laranja e agar sumo de abacaxi) com diferentes concentrações de sacarose adicionadas, foi estudada por Obeta e Ugwuanyi. A adição de sacarose nas concentrações de 10% para o sumo de abacaxi, 11.5% para o sumo de laranja e 9% para o sumo de manga aumentou o número UFCs (Unidades Formadoras de Colónias). No entanto, quando se procedeu à adição de sacarose em concentrações iguais ou superiores a 30% para o sumo de abacaxi, 31.5% para o sumo de laranja e 29% para o sumo de manga, verificou-se o efeito protetor deste açúcar contra a inativação dos ascósporos deste fungo [20].

Beuchat e Kuhn também estudaram a influência de diferentes concentrações de açúcar em geleias de uva Concord, na resistência térmica dos ascósporos de *N. fischeri*. Neste estudo, os ascósporos foram inativados mais rapidamente na fórmula de menor concentração de açúcar (56.6 °Brix, $a_w=0.82$ e pH=3.14) do que na fórmula regular (66.2 °Brix, $a_w=0.78$ e pH=3.27). Este facto evidencia o efeito protetor que soluções de compostos como o açúcar têm contra a inativação de células vegetativas e ascósporos de fungos filamentosos termorresistentes [21].

De igual forma, Beuchat investigou a influência da concentração de diferentes tipos de açúcares (sacarose, glucose e frutose) na inativação térmica dos ascósporos de *T. flavus*. Para tal, procedeu à adição individual de diferentes concentrações destes açúcares a sumo de maçã (pH=3.75), de forma a

obter valores de a_w de 0.99, 0.98 e 0.96. Este autor concluiu que, independentemente da temperatura de aquecimento utilizada, a proteção contra a inativação foi proporcional ao aumento da concentração de açúcar, no entanto, o efeito protetor não foi influenciado pelo tipo de açúcar [22].

Noutro estudo, Beuchat estudou a sobrevivência dos ascósporos de *N. fischeri* e *T. flavus* quando inoculados em pós de futa (maçã, mirtilo, uva, abacaxi e morango) com $a_w=0.23$. Após incubação a 25°C durante 8, 17 e 30 dias, as amostras foram submetidas a um tratamento térmico de 75°C durante 15 e 30 minutos para quantificação de UFC. Os resultados evidenciaram que ambos os fungos se mantiveram altamente viáveis após os 30 dias de armazenamento. Observou-se também que os ascósporos de *N. fischeri* permaneceram viáveis após a aplicação do tratamento de secagem utilizado para preparar o inócuo e, que, não precisaram de ativação térmica prévia para germinarem. O mesmo não se sucedeu com os ascósporos de *T. flavus*, que precisaram de ativação térmica para se obter a contagem máxima de UFC, o que indica que durante o armazenamento os ascósporos deste fungo permaneceram em estado de dormência [23].

Noutro estudo, Beuchat e Toledo verificaram que os ascósporos de *B. nivea* eram protegidos pela inativação térmica após a adição de sacarose a sumos e néctares de fruta. Verificaram de igual forma um aumento da proteção com o aumento da quantidade de sacarose adicionada ao meio, sugerindo que a diferença de pressão osmótica entre o meio de aquecimento e os ascósporos favorece a resistência térmica [24].

2.4.1.3. Sólidos solúveis

Maiores concentrações de sólidos solúveis no meio de aquecimento também exercem um efeito protetor nos ascósporos dos fungos termorresistentes.

Tournas e Richard estudaram o efeito da resistência térmica dos ascósporos de *N. fischeri* quando inoculados em concentrado de abacaxi (42.7 °Brix) e sumo de abacaxi (12.6 °Brix). Após aquecimento a 85, 88, 90 e 95°C durante 1 hora, verificou-se maior termorresistência dos ascósporos do fungo no concentrado de abacaxi em comparação com o sumo. Este facto evidencia o efeito protetor oferecido pelo produto concentrado, devido à maior quantidade de sólidos solúveis [25].

Noutro estudo, King e Whitehand estudaram a influência da composição do meio de aquecimento sobre a inativação térmica de *T. flavus* a 90°C. Estes autores verificaram um aumento da resistência térmica dos ascósporos à medida que se aumenta o teor de sólidos solúveis do meio de aquecimento [26].

2.4.1.4. Presença de ácidos orgânicos

Diversos estudos foram realizados de forma a perceber a influência que os ácidos orgânicos exercem na resistência térmica dos esporos fúngicos e, constatou-se, que a tolerância dos ascósporos aos ácidos orgânicos durante a exposição às temperaturas aplicadas nos processos de pasteurização de alimentos depende do tipo de ácido presente, da concentração da forma não dissociada do mesmo e do pH do meio de aquecimento.

Beuchat realizou vários estudos de forma a compreender a influência da concentração e tipo de ácido orgânico presente no meio de aquecimento, na termorresistência de três linhagens de *T. flavus*. Após exposição dos meios de aquecimento a elevadas temperaturas, constatou que os ácidos fumárico, sórbico e benzoico utilizados, apresentaram maior letalidade na inativação dos ascósporos do fungo em estudo, em comparação com os ácidos acético, málico, cítrico e tartárico. Verificou ainda um aumento da letalidade quando se procedeu à diminuição do pH do meio de aquecimento de 5.0 para 2.5 [27].

De igual forma, Splittstoesser e Splittstoesser observaram que os ascósporos de *B. fulva* e *N. fischeri* foram inativados pelo calor mais rapidamente em sumo de arando do que em sumo de uva, embora ambos os sumos apresentassem pH=2.5. A reduzida tolerância que os ascósporos destes fungos apresentam ao calor quando inoculados em sumo de arando pode ser devida à presença natural de ácido benzoico na constituição desta baga [28].

2.4.1.5. Adição de conservantes

A presença de conservantes no meio de aquecimento tende a aumentar os efeitos letais do calor. Para Splittstoesser e Churey, os ascósporos de *N. fischeri* foram afetados quando aquecidos em sumos de fruta na presença de baixas concentrações de SO₂. Os resultados mostram que a adição de 0, 5, 50 e 100 ppm de SO₂ originou valores D_{80°C} de 123, 75, 8.5 e 6.1 minutos, respetivamente. A partir destes resultados, os autores concluíram que a forma molecular não dissociada de SO₂ foi responsável pela sensibilização dos ascósporos de *N. fischeri* ao calor, uma vez que o aumentando do pH de 3.3 para 5.0 neutralizou a atividade do SO₂ [29].

Noutro estudo, Rajashekhara *et al.* avaliaram a resistência térmica de *N. fischeri* em sumo de manga e uva após adição de sorbato de potássio (0.1%) e benzoato de sódio (0.1%) ou uma combinação de ambos (0.05% de cada) aquando da sua formulação. Após aplicação de tratamento térmico a 85°C durante 120 minutos, verificaram maior inativação térmica dos ascósporos com a combinação benzoato-

sorbato para o sumo de manga, seguida da aplicação de sorbato de potássio e benzoato de sódio, com valores $D_{85^{\circ}\text{C}}$ de 44, 35 e 29 minutos, respetivamente. Para o sumo de uva, a aplicação de benzoato de sódio ($D_{85^{\circ}\text{C}}=13$ min) ou a combinação benzoato-potássio ($D_{85^{\circ}\text{C}}=13$ min) foi mais eficaz na inativação térmica dos ascósporos de *N. fischeri* do que com a aplicação de sorbato de potássio sozinho ($D_{85^{\circ}\text{C}}=32$ minutos) [30].

2.4.2. Tempo e Temperatura de incubação

Diversos estudos sugerem que a termorresistência dos microrganismos formadores de esporos tende a aumentar com o aumento do tempo e temperatura de incubação.

Por exemplo, Tournas e Traxler estudaram a influência da idade dos ascósporos de *N. fischeri* na sua termorresistência. Para tal, os ascósporos deste fungo foram incubados a 30°C durante 1, 2, 3 e 6 meses, sendo submetidos no final de cada período a um tratamento térmico de 88°C durante 1 hora. Estes autores verificaram que, para a temperatura aplicada, o aumento do tempo de incubação proporcionou um aumento da resistência térmica do fungo [25].

Beuchat também estudou a influência da temperatura de incubação e da idade da cultura de *T. flavus* utilizada, na termorresistência dos ascósporos deste fungo quando inoculados em sumo de maçã. Foi observada uma relação direta entre o aumento da idade da cultura e a termorresistência dos mesmos até aos 30 dias de incubação. No entanto, entre o 30º e o 58º dias de incubação, poucas mudanças na resistência térmica foram observadas. Relativamente à temperatura de incubação, a resistência ao calor revelou-se menor quando *T. flavus* foi incubado a 20°C , em comparação com 25 e 30°C [22].

2.5. Controlo de microrganismos nos alimentos

2.5.1. Processamento térmico

Os alimentos geralmente são processados por duas razões: preservação do alimento de forma a aumentar o tempo de prateleira, através na destruição de microrganismos capazes de crescerem no produto segundo condições normais de armazenamento, e ainda, para induzir modificações nas matérias-primas de forma a alterar e/ou melhorar as suas propriedades físico-químicas e sensoriais. O objetivo do processamento térmico é assim produzir alimentos com prazos de validade estáveis, isentos de microrganismos patogénicos e, conseqüentemente, seguros para o consumidor. Neste sentido, as

tecnologias de processamento térmico mais utilizadas nas indústrias alimentares são a esterilização e pasteurização, onde o produto alimentar é aquecido a uma dada temperatura durante um período de tempo, para que os microrganismos alvos sejam inativados.

O processo de esterilização consiste na aplicação de temperaturas extremamente altas ($>100^{\circ}\text{C}$) capazes de destruir todas as formas de microrganismos, incluído os esporos bacterianos e fúngicos, proporcionando aos alimentos tempos de prateleira superiores a 6 meses. No entanto, as temperaturas extremamente elevadas aplicadas degradam as características organolépticas do produto final, bem como as vitaminas e minerais [31]. Por sua vez, o processo de pasteurização utiliza temperaturas mais baixas para eliminação de microrganismos, normalmente entre 60 e 90°C , resultando em produtos finais com mudanças mínimas a nível organoléptico, sendo também mais aceitáveis pelo consumidor. Trata-se de uma técnica bastante eficaz em destruir a maioria dos organismos na sua forma vegetativa, com exceção, em grande parte, de microrganismos formadores de esporos, e ainda, por inativar enzimas que poderiam causar mudanças organolépticas indesejáveis no alimento. Estas tecnologias têm como base a cinética da morte térmica dos microrganismos, estando dependentes da ação combinada do tempo e da temperatura.

De forma a compreender melhor a destruição de microrganismos pela ação do calor, é necessário entender os conceitos básicos associados a esta tecnologia.

2.5.2. Definição dos parâmetros de morte térmica

Quando uma suspensão de células (células vegetativas ou esporos) de um determinado microrganismo é aquecida acima da temperatura ótima de crescimento, ocorre a lise celular, levando à morte das mesmas pela destruição dos componentes intracelulares. Num processo de destruição térmica como a pasteurização, a taxa de destruição é logarítmica, sendo que, para uma dada temperatura letal, a taxa de morte é proporcional ao número de células viáveis presentes [32].

O tempo de redução decimal, valor D , é o tempo necessário para inativar 90% da população microbiana ou reduzi-la uma ordem de grandeza logarítmica, a temperatura constante. Cada microrganismo tem um valor de D específico e quanto maior for o seu valor, mais resistência térmica irá apresentar. Na Figura 3 encontra-se a relação entre o valor de D , o tempo e o número de microrganismos sobreviventes, N [33].

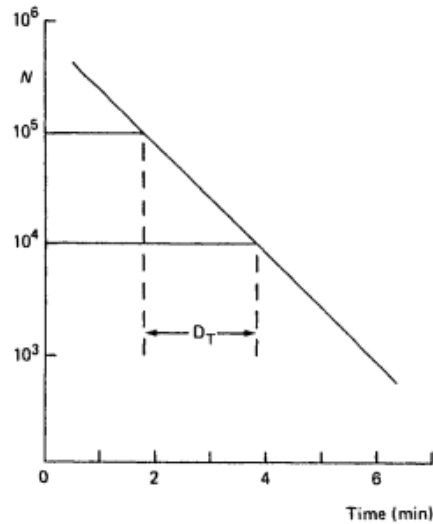


Figura 3. Relação entre a população de microrganismos viáveis em valor absoluto e o tempo, a temperatura constante (retirado de [33]).

A redução decimal é determinada pela Equação 1, onde N_0 é a população inicial, N a população sobrevivente final e t o tempo de permanência. É de realçar que, de acordo com a equação descrita é impossível atingir uma redução de 100%, uma vez que a fórmula matemática não contempla o valor zero. À medida que a temperatura de pasteurização aumenta, o valor D tende a diminuir [33,34].

$$D = \frac{t_2 - t_1}{\log_{10} N_0 - \log_{10} N} \quad \text{Equação 1}$$

A temperatura à qual o valor D se aplica é indicada por um subscrito, por exemplo, $D_{72^\circ\text{C}}$ para 72°C [32,34]. Por exemplo, para um microrganismo com um valor $D_{72^\circ\text{C}}$ de 10 segundos, o aquecimento por 10 segundos a 72°C alcançará uma redução de 90% na população microbiana, o aquecimento durante 20 segundos alcançará 2D (99%), 30 segundos alcançará 3D (99.9%) e 60 segundos alcançará uma redução de 6D (99.9999%).

Outro parâmetro que permite avaliar a resistência térmica dos microrganismos é o valor z . Este representa o intervalo de temperatura necessário para alterar o valor D em um ciclo logarítmico, o qual corresponde ao inverso negativo do declive da curva, representada na Figura 4 [34].

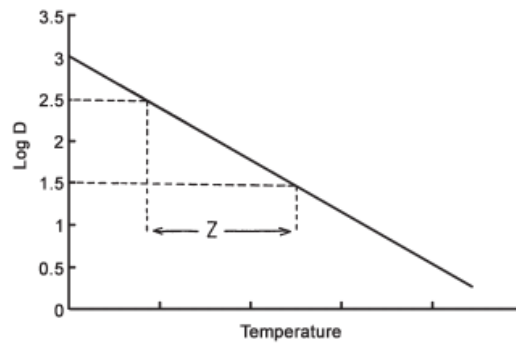


Figura 4. Relação entre o valor D e a temperatura para determinar o valor z (retirado de [34]).

Matematicamente, é possível determinar o valor z pela Equação 2.

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\log_{10} D_1 - \log_{10} D_2} \quad \text{Equação 2}$$

Assim, através destes dois parâmetros é possível estimar os binômios tempo/temperatura de pasteurização adequados à eliminação de um determinado microrganismo, representado, pela equação 3 [35].

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

Como referido anteriormente (subcapítulo 2.4.), os ascósporos de fungos filamentosos termorresistentes podem apresentar diferente resistência quando sujeitos a condições de *stress* distintas e, conseqüentemente, a diferentes padrões de temperaturas. Na tabela 1, encontra-se uma compilação dos valores D dos principais fungos termorresistentes citados nesta dissertação, quando expostos a diferentes temperaturas e meios de aquecimento [36,37].

Tabela 1. Resistência térmica de ascósporos a diferentes temperaturas e meios de aquecimento (adaptado de [36,37])

Espécie fúngica	Meio de aquecimento	T(°C)	D (minutos)
<i>Byssochlamys fulva</i>	Sumo de uva	86	13.0 - 14.0
	Solução tampão (pH 3.6; pH 5.0; 16°Brix)	90	4.0 - 36.0
<i>Byssochlamys nivea</i>	Sumo de tomate	90	8.1
	Solução tampão (pH 3.5)	85	1.3 - 4.5
<i>Neosartorya fischeri</i>	Sumo de tomate	90	1.5
	Sumo de maçã	85	13.2
	Sumo de uva	85	10.1
	Solução tampão (pH 7.0)	85	10.4
	Solução tampão (pH 7.0)	85	35.3
	Sumo de maçã	88	1.4
	Recheio de fruta	88	4.2 - 16.2
	Recheio de fruta	91	<2.0
	Sumo de tomate	90	4.4 - 6.6
<i>Talaromyces flavus</i>	Solução tampão (pH 5.0;glucose; 16°Brix)	85	39.0
	Solução tampão (pH 5.0; glucose)	85	20 - 26

2.6. Preparados de fruta FRULACT

2.6.1. Processamento industrial

O processamento alimentar é o conjunto de métodos físicos, químicos e/ou biológicos a que as matérias-primas são sujeitas, de forma a transformar as mesmas em produtos alimentares para consumo humano e, por isso, tem de ser cumpridos todos os regulamentos e normas em vigor para que os produtos estejam dentro dos limites aceitáveis por lei. Deste modo, as matérias-primas necessárias à

elaboração de preparados de fruta são sujeitas a várias etapas de transformação, como se encontra ilustrado na Figura 5, para posterior incorporação no produto final.

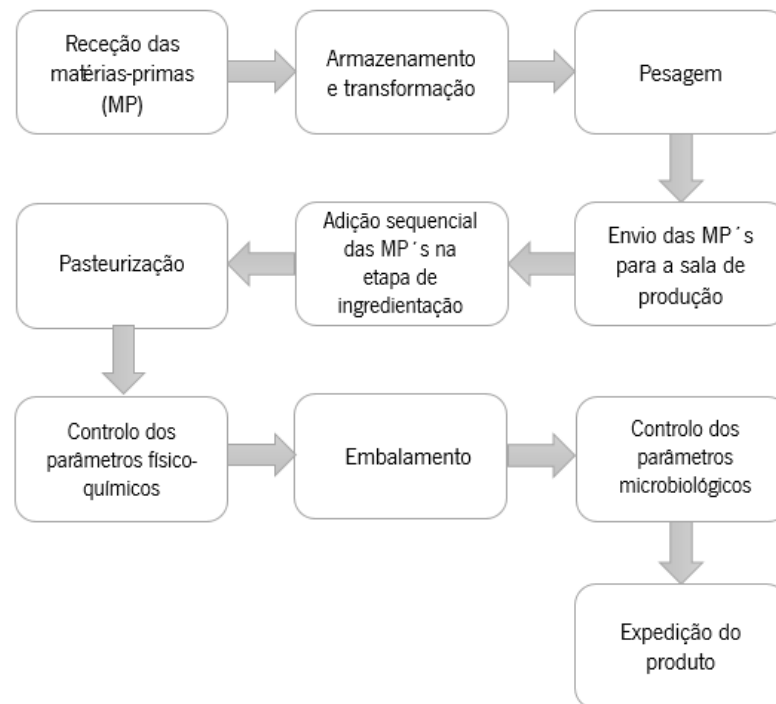


Figura 5. Esquema das etapas de processamento industrial, desde a receção das matérias-primas até à expedição do produto final.

2.6.1.1. Receção das matérias-primas, armazenamento e transformação

Na sua chegada à fábrica, as matérias-primas são codificadas de acordo com o lote a que pertencem, garantindo assim a sua correta gestão de *stocks* e rastreabilidade ao longo de todo o processo produtivo. Após a etapa de receção, estas são armazenadas de acordo com as suas necessidades, onde podem ser acondicionadas sob congelação, refrigeração ou à temperatura ambiente.

Caso haja necessidade, as matérias-primas podem ainda ser sujeitas a processos físicos como a escolha, hidratação, polpa ou corte, de acordo com a especificação de cada formulação.

2.6.1.2. Pesagem, ingredientação, pasteurização e embalamento

Na etapa de pesagem, as matérias-primas são rigorosamente pesadas de acordo com a formulação do preparado em questão. Posteriormente, são enviadas para a sala de produção onde são

adicionas sequencialmente, sob agitação, cumprindo o binómio tempo/temperatura de ingredientação estipulado. De seguida, o produto segue para o pasteurizador, onde é aplicado o binómio tempo/temperatura a ser cumprido durante o processamento térmico. De seguida, são verificados os parâmetros físico-químicos nomeadamente, consistência, pH, a_w e °Brix, para confirmar se o produto se encontra dentro dos limites acordados com o cliente.

Por último, o preparado é embalado e expedido de acordo com a conformidade dos parâmetros microbiológicos.

2.6.1.3. Composição nutricional

As frutas constituem uma excelente fonte de nutrientes, açúcares, vitaminas e fibras essenciais à dieta do ser humano. No entanto, devido ao seu elevado teor em água e abundância de nutrientes tornam-se bastante suscetíveis ao desenvolvimento microbiano. Aliado a estas condições, a composição nutricional das mesmas em termos de teor de gorduras e proteínas também exerce influência no comportamento microbiano durante a aplicação do processamento térmico. A presença de gorduras na matriz alimentar pode originar um aumento da resistência térmica de certos microrganismos, pela proteção conferida às células microbianas e por afetar diretamente o teor de água da célula. De forma semelhante, a presença de proteínas também parece exercer influência no aumento da termorresistência, pelo que, alimentos com elevado teor proteico devem ser processados a temperaturas superiores em comparação com alimentos de baixo conteúdo proteico [37]. A composição nutricional da amora, framboesa e mirtilo encontra-se representada na tabela 2.

Tabela 2. Composição nutricional da amora, framboesa e mirtilo (adaptado de [38])

Fruto	Água (g)	Carboidratos (g)	Proteína (g)	Lípidos (g)	Fibra dietética (g)
Amora	84.70	6.24	1.20	1.00	3.16
Framboesa	84.50	4.81	1.30	0.30	4.68
Mirtilo	84.60	6.05	0.60	0.60	4.90

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. Preparação dos meios de cultura

Para a elaboração das análises microbiológicas foi necessário preparar, previamente, os meios de cultura e de enriquecimento necessários para a sua realização.

Os meios de cultura utilizados foram *Potato Dextrose Agar* (PDA) (VWR Chemicals, Belgium), *Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar* (DRBC) (Merck, Germany) e *Dichloran Glycerol Chloramphenicol Agar* (DG-18) (Merck, Germany). A preparação destes meios foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, em frascos de vidro *Schott* com 500 mL de capacidade. É de salientar que a seleção dos meios de cultura, DRBC e DG-18, foi feita de acordo com a a_w do produto acabado sujeito a análise, conforme previsto pelo regulamento interno para quantificação de fungos a 25°C.

A água peptonada tamponada, *Buffered Peptone Water* (BPW) (Merck, Germany), necessária para a suspensão das amostras, foi preparada em frascos de vidro *Schott* de 100 mL de capacidade, com 90 mL deste meio. Relativamente à preparação dos tubos de diluição, foram medidos 9 mL de BPW para cada tubo de ensaio, com o objetivo de realizar as diluições sucessivas, de forma a quantificar as UFC/g.

Por fim, todos os meios de cultura utilizados, bem como as pontas de 1 mL de capacidade utilizadas nas micropipetas e o sistema de filtração necessário para a recolha do inóculo, foram sujeitos a esterilização numa autoclave (Panasonic MLS-3781L), segundo um binómio tempo/temperatura de 121°C, durante 15 minutos.

3.2. Procedimento experimental

O procedimento experimental encontra-se dividido em 4 fases: (1) elaboração dos preparados de bagas - Amora, Framboesa e Mirtilo, (2) obtenção da suspensão de ascósporos de *N. fischeri*, (3) simulação do processo de ingredientação e (4) de pasteurização.

3.2.1. Elaboração dos preparados de fruta

Os preparados de bagas utilizados no presente projeto foram elaborados segundo as formulações fornecidas pela FRULACT, tendo sido pasteurizados segundo o binómio tempo/temperatura de 95°C durante 5 minutos. Após sofrerem pasteurização, estes foram embalados de imediato a quente em

recipientes estéreis com 1 L de capacidade. Uma pequena amostra de preparado foi guardada para, após 24h, se proceder à monitorização dos parâmetros físico-químicos, nomeadamente pH (potenciómetro, *Consort C860*), °Brix (refratómetro, *Bellingham+Stanley Ltd. RFM732*) e a_w (*Rotronic Hygrolab3*). De seguida, todos os preparados elaborados foram armazenados num equipamento de refrigeração a 5 +/- 2°C até à data de utilização, de forma a evitar pós-contaminações.

Para as três frutas, foi selecionado um preparado com elevado °Brix (nível de açúcares na solução) e outro com baixo °Brix, de forma a estudar o efeito da disponibilidade da água na termorresistência do microrganismo em questão. Relativamente ao pH, todos os preparados em estudo caracterizam-se por serem bastante ácidos e por apresentarem valores de pH muito próximos entre si.

Na tabela 3, encontram-se os parâmetros físico-químicos inerentes aos diferentes preparados estudados, determinados 24 horas após a sua elaboração.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos associados aos diferentes preparados de bagas

Parâmetros Físico-Químicos			
Preparado	pH	°Brix	a_w
Amora açucarado	3.8 ± 0.2	29 ± 2	0.97
Amora edulcorado	3.7 ± 0.2	11 ± 2	0.99
Framboesa açucarado	3.5 ± 0.2	36 ± 2	0.96
Framboesa edulcorado	3.5 ± 0.2	9 ± 2	0.99
Mirtilo açucarado	3.5 ± 0.2	52 ± 2	0.92
Mirtilo edulcorado	3.5 ± 0.2	24 ± 2	0.97

3.2.2. Obtenção do inóculo

Para o estudo da resistência térmica de *N. fischeri* foi necessário proceder ao crescimento e esporulação do mesmo em grande escala para, após maturação, ser possível a recolha dos ascósporos da sua superfície.

Para tal, numa fase inicial, foram repicadas várias colónias deste fungo, provenientes de uma cultura pura, em várias placas de Petri contendo meio PDA, sob condições de assepsia. As placas foram de seguida incubadas numa estufa a 25°C durante 7 dias, para crescimento e esporulação dos

ascósporos. Após este período, a massa micelial formada na superfície do meio foi recolhida por inundação da superfície das placas com 3 mL de água destilada estéril, onde se procedeu à raspagem suave das mesmas com o auxílio de uma ansa estéril. As suspensões provenientes das placas foram recolhidas para tubos *Falcon* estéreis. De seguida, proporções de 2 mL de suspensão foram inoculadas em garrafas estéreis de 1 L contendo 350 mL de PDA inclinado, conforme ilustrado na Figura 6a. As garrafas foram incubadas a 30°C durante 6 a 8 semanas, para produção e maturação dos ascósporos.

Decorrido o período de incubação, procedeu-se à recolha dos ascósporos da superfície do meio das garrafas inclinadas (Figura 6b). Para tal, foi adicionado 200 mL de BPW a cada garrafa, seguindo-se a agitação manual das mesmas de forma vigorosa, para uma maior rutura e libertação de ascósporos dos ascos. A suspensão recolhida, constituída por hifas residuais, ascos e ascósporos, foi posteriormente filtrada com o auxílio de um sistema de filtração a vácuo, através de filtros estéreis de 25 µm de porosidade (Figura 6c). Após filtração, a suspensão constituída por ascósporos livres foi recolhida em tubos *Falcon*, passando a ser este o inóculo utilizado nas etapas posteriores. O inóculo foi armazenado no frigorífico a $5 \pm 2^\circ\text{C}$.

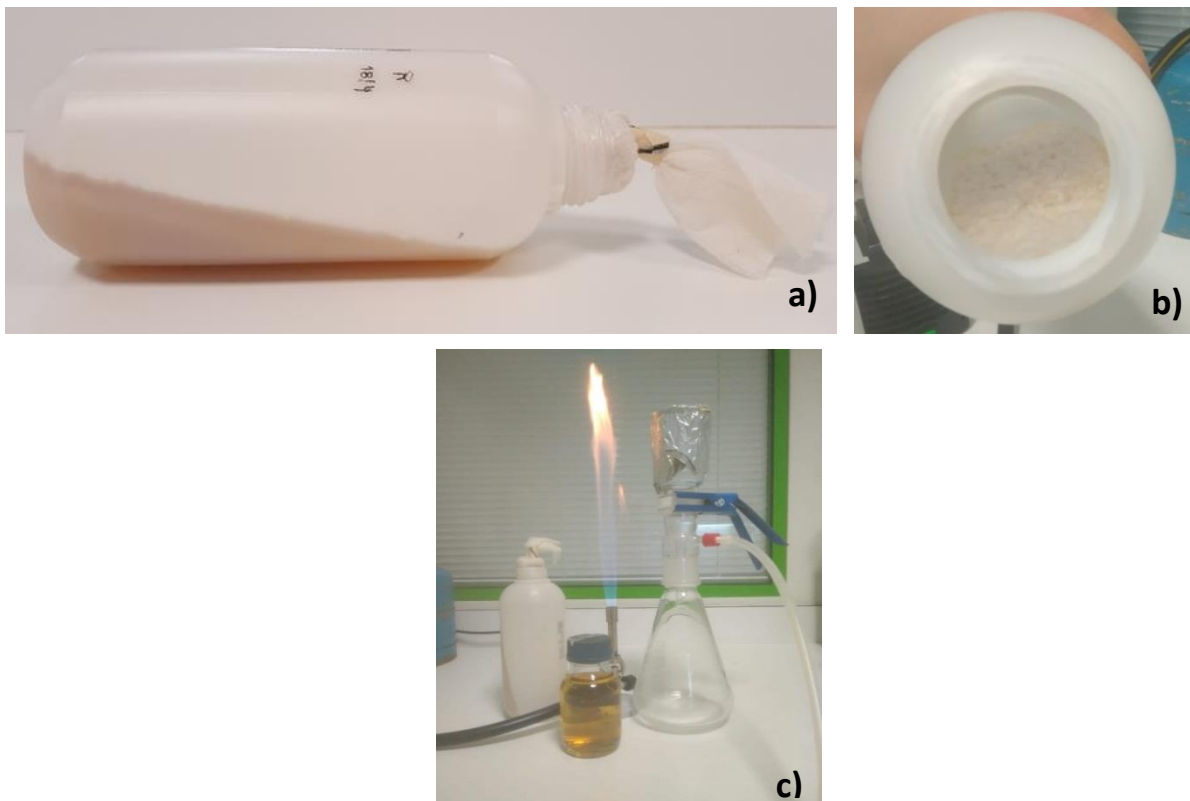


Figura 6. a) Garrafa inclinada com meio PDA utilizada no crescimento e maturação da cultura de *N. fischeri*; b) Interior da garrafa onde é possível a observação da massa micelial com 5 semanas de incubação a 25°C; c) Sistema de filtração a vácuo utilizado para a recolha do inóculo.

3.2.3. Etapa de Ingredientação

Antes de se proceder à determinação dos parâmetros de morte térmica de *N. fischeri* descritas no subcapítulo 3.2.4., procedeu-se à simulação da etapa de ingredientação à escala laboratorial (Figura 7). Esta etapa do processo reveste-se de especial importância, na medida em que simula o binómio tempo/temperatura a que os preparados são sujeitos em fábrica.

Para este efeito, pesou-se, em condições de assepsia, 88 g (80%) de preparado estéril para frascos *Schott* de 250 mL previamente esterilizados, e, inoculou-se os mesmos com 22 mL (20%) da suspensão de ascósporos obtida no subcapítulo 3.2.2. O preparado inoculado foi cuidadosamente homogeneizado e colocado num banho térmico para simulação dos binómios tempo/temperatura de ingredientação aplicados, nomeadamente 30°C/1h e 30°C/3h. Decorrido o tempo de ensaio, foram pesados 10 g de preparado ingredientado para frascos *Schott* contendo 90 mL de BPW, de forma a quantificar a carga de *N. fischeri* no pré-mix.

É de salientar que o preparado resultante desta etapa passou a ser utilizado como inóculo na fase posterior à etapa de ingredientação, descrita no subcapítulo 3.2.4.

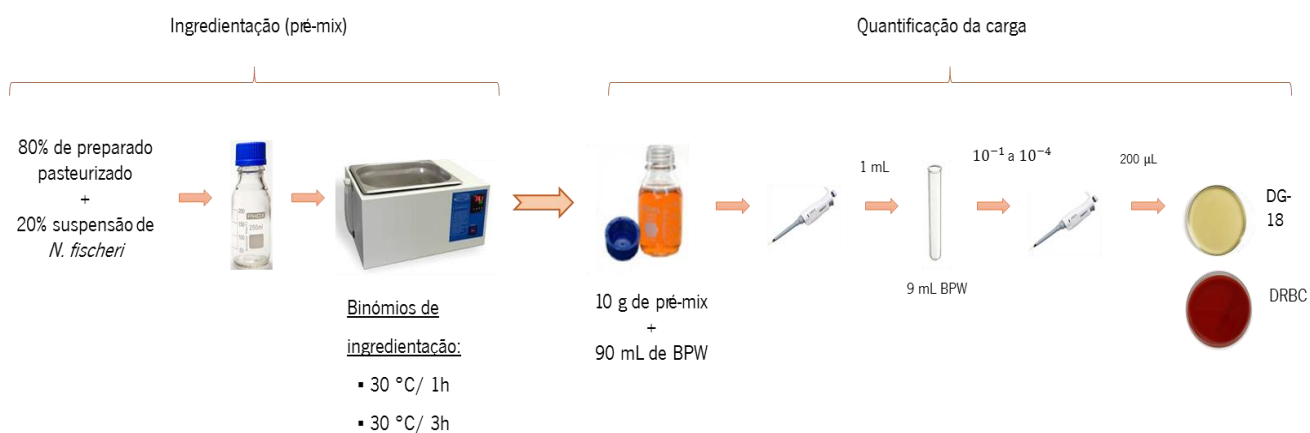


Figura 7. Esquema representativo da fase de ingredientação dos preparados de fruta.

3.2.4. Pasteurização

Após o binómio tempo/temperatura de ingredientação ter sido cumprido, pesou-se 5 g (50%) de preparado pasteurizado juntamente com 5 g (50%) de preparado, previamente inoculado e submetido à etapa de ingredientação, para tubos *Falcon* de 50 mL. Depois de selados, em condições de assepsia, procedeu-se à sua homogeneização num *vortex*.

De seguida, os frascos foram submetidos a três temperaturas de pasteurização - 70°C, 80°C e 90°C - durante 5 minutos. Ao longo do tempo de pasteurização foram retiradas amostras do banho térmico correspondentes aos tempos t0, t1, t2, t3, t4 e t5. Note-se que cada tempo de amostragem foi realizado em triplicado, conforme representado no esquema ilustrativo da Figura 8. Após arrefecimento, pesou-se 10 g de preparado proveniente de cada tubo *Falcon* para frascos com 90 mL de BPW, onde ficaram a repousar durante 30 minutos, para posteriormente se proceder à sua quantificação microbiológica, de forma a determinar os parâmetros de morte térmica de *N. fischeri* nas diferentes condições de processamento.



Figura 8. Esquema representativo da fase de pasteurização dos preparados de fruta.

3.3. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas realizadas tiveram por base o procedimento interno relativo à quantificação de fungos a 25°C.

Com base neste procedimento, pesou-se 10 g de amostra a analisar, junto ao bico de *Bunsen* para 90 mL de BPW e deixou-se repousar durante 30 minutos. Terminado este tempo, na câmara de fluxo laminar (*Faster Smart Fast*, Italy) com o auxílio de uma micropipeta volumétrica (*VWR Ergonomic*

High Performance pipet, Belgium), transferiu-se 1 mL da suspensão inicial da amostra para tubos de diluição com 9 mL de BPW até se completarem as três diluições 9:1 previamente estipuladas. De seguida, foi transferido 200 µL da suspensão-mãe, provenientes de cada diluição, em placas de Petri (previamente vertidas com o meio de cultura adequado ao valor de a_v do preparado em análise). Este procedimento foi realizado em duplicado no interior da câmara de fluxo laminar.

3.4. Análise estatística

Todos os resultados experimentais obtidos ao longo deste projeto foram sujeitos a um tratamento estatístico, onde foi calculada a média aritmética dos valores obtidos na quantificação da carga microbiana dos diferentes ensaios, bem como o cálculo do desvio-padrão correspondente. De forma a identificar diferenças significativas entre os binómios tempo/temperatura de ingredientação estudados, foi aplicado o teste ANOVA fator único com nível de significância de 95%, com o auxílio do suplemento de Análise de Dados do programa Microsoft Office Excel.

Por último, foram obtidos todos os valores de R^2 associados a cada um dos ajustes lineares efetuados para calcular os parâmetros cinéticos de morte térmica (D e z).

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Como mencionado anteriormente, o objetivo último deste projeto de dissertação foi a avaliação do impacto de diferentes binómios tempo/temperatura de ingredientação no comportamento de *N. fischeri*, mais precisamente, no aumento ou diminuição da sua resistência térmica. O estudo do seu comportamento nas diferentes matrizes alimentares é de especial interesse para a FRULACT pois, como se trata de um fungo filamentosso produtor de esporos, este terá uma grande influência na escolha dos binómios tempo/temperatura de pasteurização, dada a elevada termorresistência associada.

4.1. Avaliação do impacto de diferentes binómios tempo/temperatura de ingredientação e pasteurização na carga microbiana dos preparados de bagas

De modo a avaliar o impacto da etapa de ingredientação na resistência térmica de *N. fischeri*, foram aplicados dois binómios de ingredientação - 30°C/ 1h e 30°C/ 3h - nos diferentes preparados de fruta elaborados, inoculados com 20% de *N. fischeri*. Posteriormente, foi realizado um tratamento térmico (pasteurização) conforme descrito no subcapítulo 3.2.4., onde, a determinação da carga fúngica final permitiu o cálculo dos parâmetros de morte térmica apresentados no subcapítulo 4.2.

Depois de realizadas as análises referentes à carga microbiana para cada binómio tempo/temperatura de ingredientação e pasteurização aplicados aos diferentes preparados, foi possível a obtenção dos resultados ilustrados na Figura 9, construídos a partir da média da carga total obtida ao longo do tempo, conforme sumariado no anexo A.

Analisando a Figura 9 é possível observar que *N. fischeri* apresenta crescimento nos dois binómios tempo/temperatura de ingredientação estudados, não sendo possível a eliminação completa deste fungo nos diferentes preparados, mesmo após aplicação do binómio de pasteurização mais severo, nomeadamente 90°C/5 min.

É ainda possível verificar que, na sua generalidade, *N. fischeri* apresenta maior carga microbiana quando sujeito ao binómio de ingredientação 30°C/ 3h. Sabendo que os ascósporos deste fungo são capazes de crescer e germinar numa gama de temperaturas compreendida entre os 10 e 50°C, a aplicação desta temperatura de ingredientação revela-se uma condição ótima para o seu desenvolvimento e proliferação. Aliado a este fator, o tempo de permanência de 3 horas durante o *holding* a que os preparados são submetidos em fábrica revela-se uma situação favorável, permitindo a adaptação do mesmo ao meio de aquecimento.

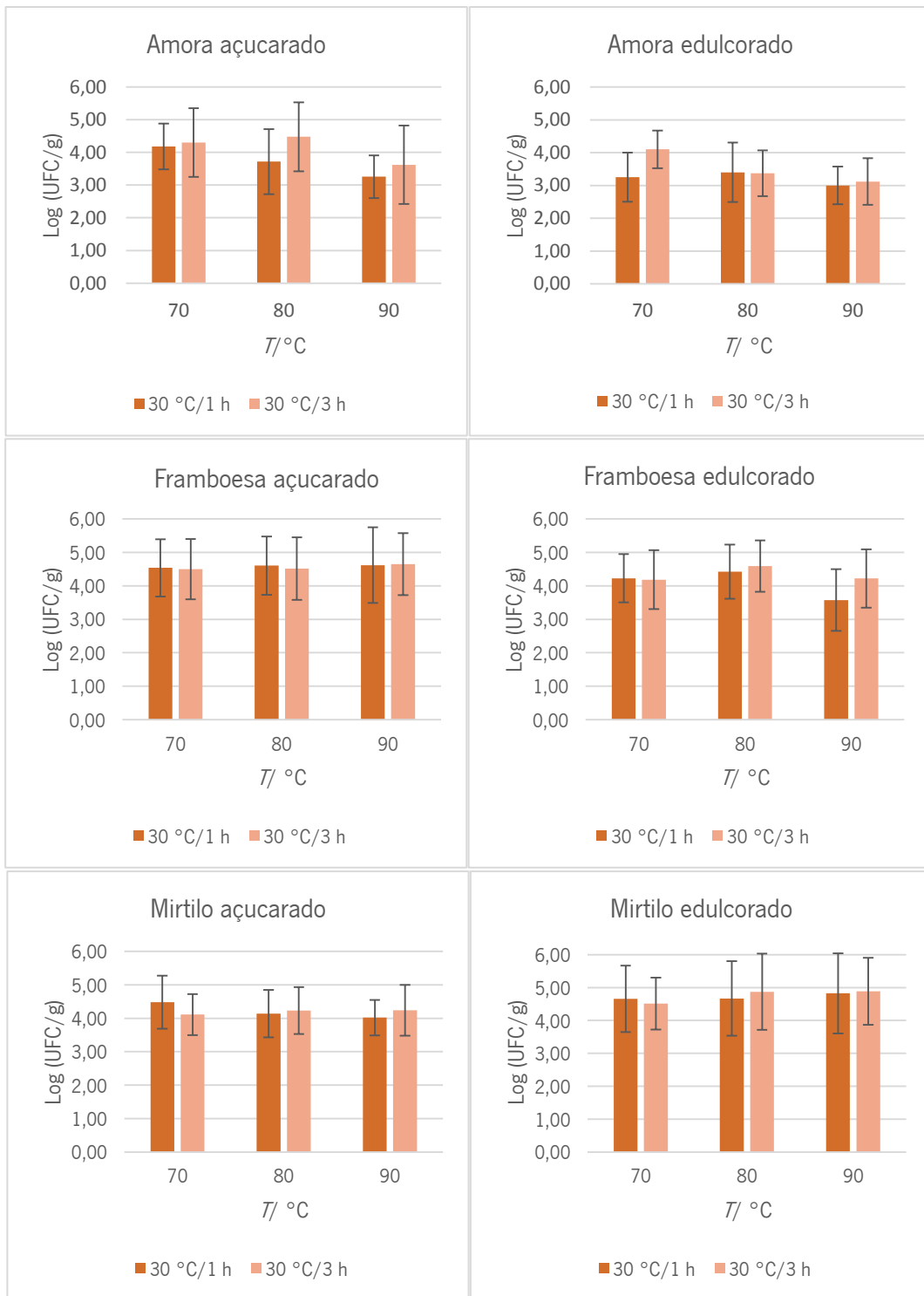


Figura 9. Carga microbiana obtida em cada um dos binómios às diferentes temperaturas de pasteurização aplicadas.

4.2. Determinação dos parâmetros cinéticos de morte térmica

De forma a determinar os parâmetros de cinética de inativação térmica de *N. fischeri* nos diferentes preparados de bagas foi aplicado o protocolo descrito no subcapítulo 3.2.4. A determinação da carga microbiana ao longo do tempo de pasteurização (anexo A), para as três temperaturas de morte estudadas - 70, 80 e 90°C - permitiu a construção de curvas de morte, necessárias para a determinação de D e z (anexo B) através do cálculo do inverso negativo do declive.

Na tabela 4, encontram-se sumariados os valores de D e z obtidos para os diferentes preparados de bagas, nos diferentes binómios tempo/temperatura de ingredientação estudados.

Tabela 4. Valores D e z obtidos para os diferentes preparados de bagas, nos binómios tempo/temperatura de ingredientação estudados

	Binómio de ingredientação	D (minutos)			z (°C)
		70°C	80°C	90°C	
Amora açucarado	30°C/ 1h	66.1	13.9	7.5	21.7
	30°C/ 3h	40.0	83.3	5.1	22.2
Amora edulcorado	30°C/ 1h	-	-	37.0	-
	30°C/ 3h	66.7	55.6	25.6	47.6
Framboesa açucarado	30°C/ 1h	90.9	83.3	45.5	66.7
	30°C/ 3h	47.6	55.6	16.9	45.5
Framboesa Edulcorado	30°C/ 1h	24.4	54.6	23.3	27.0
	30°C/ 3h	43.5	41.7	5.6	22.7
Mirtilo açucarado	30°C/ 1h	-	41.7	23.3	40.0
	30°C/ 3h	25.6	50.0	35.7	-
Mirtilo Edulcorado	30°C/ 1h	45.5	33.3	32.2	125.0
	30°C/ 3h	63.3	-	36.0	83.3

Numa análise inicial à tabela 4 é possível observar que para o binómio tempo/temperatura de ingredientação 30°C/1h aplicado ao preparado de amora edulcorado não foi possível a determinação dos valores D para as temperaturas de pasteurização de 70 e 80°C. O mesmo se sucede com o preparado de mirtilo açucarado para o mesmo binómio tempo/temperatura de ingredientação, à temperatura de pasteurização de 70°C. De semelhante modo, não foi possível a determinação de D para o preparado de mirtilo edulcorado nas condições de ingredientação 30°C/3h à temperatura de 80°C.

Esta incapacidade em determinar os valores de D deve-se ao facto de não se verificar a perda da viabilidade dos ascósporos de *N. fischeri*, mas sim a manutenção da sua carga ao longo do tempo de pasteurização (anexo A, tabelas A2, A5 e A6), pelo que estes parâmetros não serão considerados na presente discussão. Perante estas situações, teria sido desejável a realização de mais ensaios laboratoriais utilizando temperatura de pasteurização mais elevadas, contudo o tempo disponível para a realização deste trabalho não o permitiu.

De forma a estudar o efeito da a_w na termorresistência de *N. fischeri*, foram analisadas duas referências distintas, para a mesma tipologia de fruto. Assim, para os diferentes frutos estudados - amora, framboesa e mirtilo - seleccionou-se uma referência com elevada a_w - traduzida pelo baixo °Brix dos preparados edulcorados - e outra com baixa a_w - traduzida pelo elevado °Brix dos preparados açucarados. De acordo com a literatura, o aumento do °Brix proporcionado por certos açúcares como a sacarose, potencia a termorresistência dos microrganismos, contudo, podem surgir exceções devido à ação combinada que diferentes compostos exercem em matrizes alimentares distintas [21,24].

4.2.1. Preparado de amora

Os resultados referentes aos valores de D e z obtidos experimentalmente para os preparados de amora encontram-se compilados na tabela 5.

Tabela 5. Valores de D e z para o preparado de amora açucarado e edulcorado

	Binómio de ingredientação	D (minutos)			z (°C)
		70°C	80°C	90°C	
Amora açucarado	30°C/ 1h	66.1	13.9	7.5	21.7
	30°C/ 3h	40.0	83.3	5.1	22.2
Amora edulcorado	30°C/ 1h	-	-	37.0	-
	30°C/ 3h	66.7	55.6	25.6	47.6

Através da análise da tabela é possível observar que, de uma forma geral, D diminui com o aumento da temperatura de pasteurização, tanto para a referência edulcorada, como açucarada, para os binómios tempo/temperatura de ingredientação estudados. Estes dados vão de encontro ao expectável, pois sabe-se que, com o aumento da temperatura é necessário menos tempo para destruir 90% da população microbiana presente na amostra [33]. No entanto, esta tendência não se verifica para o preparado de amora açucarado quando submetido ao binómio tempo/temperatura de ingredientação

30°C/3h, uma vez que, o valor de D obtido para a temperatura de pasteurização de 80°C foi superior ao valor encontrado para a temperatura de 70°C. Contudo, é importante ter em atenção que este resultado deriva de um ajuste de dados experimentais com um baixo valor de R^2 (anexo B, tabela B1), ou seja o conjunto de valores gerados nestas condições não é reproduzível, o que pode estar relacionado com o facto de as amostras de ascósporos se apresentarem bastante heterogéneas, resultando numa grande variabilidade na quantificação fúngica.

É possível ainda observar que, para o preparado de amora açucarado, o prolongamento do tempo da etapa de ingredientação não parece ter influência na termorresistência de *N. fischeri*, pois os valores de z obtidos foram muito próximos entre si. Este estudo não pode ser realizado para o preparado de amora edulcorado devido à incapacidade em determinar o valor de z, para o binómio tempo/temperatura de ingredientação 30°C/1h.

Analisando a influência da maior ou menor concentração de açúcares, e, indiretamente da a_w , na termorresistência do microrganismo-alvo - para o caso particular do binómio tempo/temperatura de ingredientação 30°C/3h - verifica-se que os resultados não vão de encontro ao esperado pela literatura. Deste modo, não se observa o aumento da termorresistência no preparado açucarado, pois os valores de D e z foram inferiores aos obtidos para o preparado de amora edulcorado.

Verifica-se assim, para esta tipologia de fruta, um aumento da termorresistência de *N. fischeri* em condições de elevada a_w e baixo teor de sólidos solúveis.

4.2.2. Preparado de framboesa

Os resultados referentes aos valores de D e z para os preparados de framboesa encontram-se compilados na tabela 6.

Tabela 6. Valores de D e z obtidos para o preparado de framboesa açucarado e edulcorado

		D (minutos)			z (°C)
		70°C	80°C	90°C	
Framboesa açucarado	Binómio de ingredientação 30°C/ 1h	90.9	83.3	45.5	66.7
	30°C/ 3h	47.6	55.6	16.9	45.5
Framboesa edulcorado	30°C/ 1h	24.4	54.6	23.3	27.0
	30°C/ 3h	43.5	41.7	5.6	22.7

Comparando e analisando os valores da tabela, é possível observar que os valores de D obtidos para o preparado de framboesa açucarado, nos dois binômios tempo/temperatura de ingredientação estudados, são superiores aos valores obtidos para o preparado de framboesa edulcorado, em todas as temperaturas de morte aplicadas. É possível ainda constatar que para o binômio tempo/temperatura de ingredientação 30°C/1h se verifica uma diferença significativa dos valores de D da referência açucarada em comparação com a referência edulcorada. Estes dados vão de encontro aos mencionados na literatura, evidenciando o efeito protetor que as soluções de compostos açucarados exercem nos ascósporos de fungos termorresistentes, dificultando a sua inativação pelo processamento térmico aplicado. Assim, para os binômios tempo/temperatura de ingredientação e pasteurização aplicados, é necessário um intervalo de tempo mais longo para garantir a redução de um ciclo logarítmico da carga microbiana presente na matriz açucarada.

Mais ainda, verifica-se que quando ambas as referências são sujeitas a um binômio tempo/temperatura de ingredientação 30°C/1h a termorresistência microbiana aumenta, o que se traduz pela necessidade de aplicação de um valor de z maior - quando comparado com o binômio tempo/temperatura de 30°C/3h. Isto significa que é necessário um incremento de temperatura maior para que seja possível a aplicação de um menor valor de D.

Em suma, através dos testes laboratoriais realizados para esta tipologia de fruta parece observar-se um aumento da termorresistência de *N. fischeri* com a diminuição da a_w da matriz alimentar, bem como a diminuição do tempo de permanência na etapa de ingredientação. Embora na literatura seja referido que a manutenção de microrganismos em condições favoráveis ao seu crescimento, por longos períodos de tempo, estimule a termorresistência que lhes está associada, tal não se verificou neste caso. No entanto, esta análise encontra-se pouco sustentada, pois só se observaram diferenças estatisticamente significativas para a temperatura de morte de 80°C.

4.2.3. Preparado de mirtilo

Os resultados referentes aos valores de D e z obtidos para os preparados de mirtilo encontram-se sumariados na tabela 7.

Tabela 7. Valores de D e z obtidos para o preparado de mirtilo açucarado e edulcorado

	Binómio de ingredientação	D (minutos)			z (°C)
		70°C	80°C	90°C	
Mirtilo açucarado	30°C/ 1h	-	41.7	23.3	40.0
	30°C/ 3h	25.6	50.0	35.7	-
Mirtilo edulcorado	30°C/ 1h	45.5	33.3	32.2	125.0
	30°C/ 3h	63.3	-	36.0	83.3

Através da análise da tabela é possível observar que, de forma semelhante ao que ocorreu com as outras tipologias de fruta, se verifica uma diminuição do valor de D com o aumento da temperatura de pasteurização [33]. No entanto, esta tendência não se verifica para o preparado de mirtilo açucarado, quando sujeito ao binómio tempo/temperatura de ingredientação 30°C/3h, uma vez que os valores de D encontrados para as temperaturas de pasteurização de 80 e 90°C foram superiores ao obtido para o binómio tempo/temperatura de pasteurização 70°C/5min. Isto significa que, para a temperatura de pasteurização mais elevada, $D_{90^{\circ}\text{C}} = 35,7$ min, é preciso um intervalo de tempo superior para garantir a redução de um ciclo logarítmico da carga microbiana, do que ao obtido na aplicação da temperatura de pasteurização mais baixa, $D_{70^{\circ}\text{C}} = 25,6$ min, o que é contraditório com o que se encontra descrito na literatura. Adicionalmente, nestas condições, observa-se não ser possível o cálculo do valor de z pois os valores de D são inconsistentes e aumentam à medida que a temperatura de pasteurização aumenta - originando valores de z negativos, o que fisicamente é impossível. Por se tratar de uma cultura muito resistente, deveria ter-se utilizado temperaturas de pasteurização mais elevadas durante mais tempo, de forma a se conseguir gerar estes valores.

Relativamente ao preparado de mirtilo edulcorado, este revela-se como sendo aquele que aufer melhores condições à resistência térmica de *M. fisheri*, estando-lhe associado valores de z elevados em ambos os binómios tempo/temperatura de ingredientação estudados, assim como elevados valores de D. Tratando-se este preparado de uma solução com mais água disponível, e, apresentando menor quantidade de sólidos solúveis, comparativamente ao preparado de mirtilo açucarado, este

comportamento não seria expectável. Teoricamente, a diminuição da a_w (devido à adição de sal, açúcar, secagem ou cura), resulta na inibição do crescimento microbiano. Além disso, as soluções açucaradas conferem proteção contra a inativação de estruturas mais resistentes, como os esporos fúngicos e bacterianos, pois funcionam como uma barreira protetora contra a atuação do calor. Contudo, mais uma vez como não foi possível a determinação de valores de D, nas diferentes condições estudadas para a referência açucarada e edulcorada, bem como a determinação de valores de z tendo por base apenas dois pontos experimentais, esta conclusão encontra-se pouco sustentada, pelo que seria necessário a realização de mais ensaios para a sua validação.

4.3. Simulação dos binómios de pasteurização que melhor se adequam à eliminação de *N. fischeri*

Fazendo uma análise a todos os pontos anteriormente discutidos, obtidos ao longo do presente projeto de dissertação, é possível concluir quais as condições mais favoráveis à eliminação de *N. fischeri*, segundo as necessidades da empresa, e, tendo em consideração o menor custo associado ao processo. Para além disso, têm de ser tidas em consideração as condições que melhor permitem a preservação das características organolépticas dos preparados de fruta FRULACT, de forma a não comprometer a qualidade alimentar dos mesmos. Assim, torna-se importante a utilização de temperaturas mais baixas e reduzidos tempos de processamento.

Conhecendo os valores de D e z, apresentados nas tabelas 5, 6 e 7 procedeu-se à avaliação dos binómios tempo/temperatura de pasteurização adequado à eliminação de *N. fischeri* nos diferentes preparados de fruta. Para tal, foi necessário recorrer à equação 3 presente no subcapítulo 2.5.2., tendo-se considerado a redução de um ciclo logarítmico, a 100°C.

Os valores obtidos encontram-se representados na tabela 8.

Tabela 8. Simulação dos binómios tempo/temperatura de pasteurização adequados à eliminação de *N. fischeri* nos preparados de fruta

Preparado	Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização
Amora açucarado	30°C/1h	100°C/3 min
	30°C/3h	100°C/2 min
Amora edulcorado	30°C/1h	-
	30°C/3h	100°C/11 min
Framboesa açucarado	30°C/1h	100°C/32 min
	30°C/3h	100°C/10 min
Framboesa edulcorado	30°C/1h	100°C/10 min
	30°C/3h	100°C/2 min
Mirtilo açucarado	30°C/1h	100°C/13 min
	30°C/3h	-
Mirtilo edulcorado	30°C/1h	100°C/27 min
	30°C/3h	100°C/28 min

Analisando a tabela 8, é possível observar que os resultados apresentam uma tendência para o aumento da termorresistência, com a diminuição da duração da etapa de ingredientação. Verifica-se assim, para o binómio tempo/temperatura de ingredientação 30°C/1h, a necessidade de pasteurizar durante mais tempo os preparados de forma a reduzir a população microbiana em 90%.

Capítulo 5 - Conclusões finais e Recomendações

Depois de analisados os dados obtidos, pode-se concluir que os principais objetivos propostos para este projeto de dissertação foram cumpridos. Foi realizado um estudo do comportamento de *N. fischeri* em preparados de bagas FRULACT - amora, framboesa e mirtilo - açucarados e edulcorados, com baixos e elevados valores de a_w , quando sujeitos a diferentes binómios tempo/temperatura de ingredientação e pasteurização. Adicionalmente, foram determinados os parâmetros cinéticos de morte térmica (D e z) para cada condição e com estes dados foi possível a simulação dos binómios tempo/temperatura de pasteurização a utilizar em fábrica.

Relativamente ao comportamento deste microrganismo durante a aplicação de diferentes binómios tempo/temperatura de pasteurização, é possível concluir que, como esperado, o valor de D diminui com o aumento da temperatura. Este aspeto foi observado em todos os preparados estudados, para os diferentes binómios tempo/temperatura de ingredientação aplicados, onde se verifica que, à temperatura de morte mais elevada aplicada (90°C) foi obtido um intervalo de tempo menor para reduzir em 90% a população inicial, em comparação com as temperaturas de 70 e 80°C. No entanto, para a temperatura de 80°C observa-se um incremento dos valores de D em relação aos valores obtidos a 70°C, sugerindo que esta possa ser uma temperatura mais favorável ao desenvolvimento de termorresistência do fungo *N. fischeri*. Assim, seria importante a realização de mais ensaios laboratoriais, de forma a estudar o comportamento microbiano nesta temperatura de pasteurização, nos diferentes binómios tempo/temperatura de ingredientação estudados.

Após a realização das análises microbiológicas aos preparados de amora açucarado e edulcorado, e, tendo em consideração os parâmetros de morte térmica obtidos, é possível concluir que para o preparado de amora açucarado a duração da etapa de ingredientação não parece ter influência na resistência térmica de *N. fischeri*, uma vez que os valores de D e z obtidos para os binómios 30°C/1h e 30°C/3h são bastante semelhantes entre si. Assim, para o binómio de ingredientação 30°C/1h foi obtido um valor $D_{90^\circ\text{C}} = 7,5$ min e um valor de $z = 21,7^\circ\text{C}$, e, para o binómio de ingredientação 30°C/3h foi obtido um valor de $D_{90^\circ\text{C}} = 5,1$ min e $z = 22,2^\circ\text{C}$. Por sua vez, para o preparado de amora edulcorado nada pode ser concluído relativamente à influência da diminuição da duração da etapa de ingredientação, uma vez que não foi possível a obtenção dos valores de D e z para o binómio tempo/temperatura de ingredientação 30°C/1h. No entanto, para o binómio tempo/temperatura de ingredientação 30°C/3h obteve-se um valor de $D_{90^\circ\text{C}} = 25,6$ min e $z = 47,6^\circ\text{C}$, o que permite concluir que, para este tempo de

ingredientação, o preparado de amora edulcorado potencia o aumento da resistência térmica deste microrganismo.

Relativamente aos preparados de framboesa foi possível observar que o aumento do °Brix e a diminuição do tempo de permanência na etapa de ingredientação, aumenta a termorresistência de *N. fischeri*. Desta forma, após realização da simulação dos diferentes binómios tempo/temperatura de pasteurização foi possível verificar que, para se reduzir a população deste microrganismo no preparado de framboesa açucarado, em 1 ciclo logarítmico, a 100°C, são necessários 32 minutos quando exposto a um binómio tempo/temperatura de ingredientação de 30°C/1h, e, 10 minutos quando exposto a um binómio tempo/temperatura de ingredientação 30°C/3h. Por sua vez, para o preparado de framboesa edulcorado são necessários 10 e 2 minutos, quando exposto aos binómios tempo/temperatura de ingredientação 30°C/1h e 30°C/3h, respetivamente.

De forma semelhante ao observado com o estudo da amora, verifica-se maior resistência térmica de *N. fischeri* no preparado de mirtilo edulcorado em comparação com a referência açucarada, após a exposição deste microrganismo ao binómio tempo/temperatura de ingredientação de 30°C/1h. No entanto, para esta tipologia de fruto não foi possível correlacionar a duração da etapa de ingredientação com a a_w dos preparados, uma vez que não foi possível o cálculo de z no binómio de ingredientação 30°C/3h da referência açucarada. Assim, para o binómio de ingredientação de 30°C/1h é necessário aplicar um tempo de pasteurização de 13 e 27 minutos para o preparado de mirtilo açucarado e edulcorado, respetivamente.

Para futuros trabalhos, aconselha-se a repetição de alguns ensaios para uma melhor compreensão do comportamento microbiano de *N. fischeri* em preparados FRULACT, nomeadamente, para a temperatura de pasteurização de 80°C. Em termos dos binómios tempo/temperatura de pasteurização, seria interessante o estudo da aplicação de temperaturas de morte mais elevadas, assim como a aplicação de tempos mais prolongados de modo a entender melhor o comportamento microbiano. De forma similar, seria interessante o estudo de diferentes temperaturas de ingredientação, de forma a compreender melhor o impacto desta etapa no aumento ou diminuição da resistência térmica de *N. fischeri*, uma vez que a temperatura de ingredientação utilizada é favorável ao crescimento e proliferação deste fungo. Era igualmente desejável a realização de um maior número de réplicas, uma vez que há cotagem de fungos está sempre associada uma grande variabilidade e erro, traduzida por elevados desvios que apresentam grande impacto no cálculo dos valores de D e z .

Bibliografia

- [1] C. Costa, “Avaliação e revisão da conformidade das fichas técnicas de matérias primas, aditivos e materiais de embalagem no âmbito da norma NP EN 22000:2005,” Universidade Católica Portuguesa, 2013.
- [2] O. Samuel, O. Ifeanyi, and O. Ugochukwu, “Filamentous Fungi Associated with the Spoilage of Post-Harvest Sweet Orange Fruits (Citrus Sinensis) Sold in Awka Major Markets , Nigeria,” vol. 3, no. 3, pp. 44–49, 2015.
- [3] M. Nobre, “Bioquímica e Fisiologia Microbianas,” 2015.
- [4] P. C. S. Sephton-Clark and K. Voelz, “Spore Germination of Pathogenic Filamentous Fungi,” in *Advances in Applied Microbiology*, vol. 102, Academic Press Inc., 2018, pp. 117–157.
- [5] J. Dijksterhuis, “Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage,” *Food Microbiol.*, vol. 81, pp. 2–11, Aug. 2019.
- [6] J. Takahashi, G. Lima, G. dos Santos, F. H. Lyra, and A. D’Silva, “Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados,” *Rev. Virtual Quim.*, vol. 09, 2017.
- [7] S. Samapundo, A. Vroman, M. Eeckhout, and F. Devlieghere, “Effect of heat treatment intensity on the survival, activation and subsequent outgrowth of *Byssoschlamys nivea* ascospores,” *LWT*, vol. 93, pp. 599–605, Jul. 2018.
- [8] E. Rico-Munoz, “Heat resistant molds in foods and beverages: recent advances on assessment and prevention,” *Current Opinion in Food Science*, vol. 17. Elsevier Ltd, pp. 75–83, 01-Oct-2017.
- [9] A. D. Hocking, “*Aspergillus* and related teleomorphs,” *Food Spoilage Microorg.*, pp. 451–487, Jan. 2006.
- [10] I. J. McEvoy and M. R. Stuart, “Temperature Tolerance of *Aspergillus fischeri* var. *Glaber* in Canned Strawberries,” *Irish Journal of Agricultural Research*, vol. 9. TEAGASC-Agriculture and Food Development Authority, pp. 59–67.
- [11] D. F. Splittstoesser and C. M. Splittstoesser, “ASCOSPORES OF *Byssoschlamys fulva* COMPARED WITH THOSE OF A HEAT RESISTANT *Aspergillus*,” *J. Food Sci.*, vol. 42, no. 3, pp. 685–688, 1977.
- [12] P. V Nielsen, L. R. Beuchał, and J. C. Frisvad, “Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54, no. 6, pp. 1504–10, Jun. 1988.
- [13] J. M. Jay and J. M. Jay, “Intrinsic and Extrinsic Parameters of Foods That Affect Microbial Growth,”

- in *Modern Food Microbiology*, Boston, MA: Springer US, 2005, pp. 38–62.
- [14] H. M. Húngaro, W. E. L. Peña, N. B. M. Silva, R. V. Carvalho, V. O. Alvarenga, and A. S. Sant'Ana, "Food Microbiology," in *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, Elsevier, 2014, pp. 213–231.
- [15] V. Tournas, "Heat-Resistant Fungi of Importance to the Food and Beverage Industry," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 20, no. 4, pp. 243–263, 1994.
- [16] V. Tournas, "Growth Characteristics, Heat Resistance and Ascospore Ultrastructure of *Neosartorya fischeri*," University of Rhode Island, Kingston, 1989.
- [17] D. E. Conner and L. R. Beuchat, "Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 4, no. 4, pp. 303–312, 1987.
- [18] A. D. KING and L. C. WHITEHAND, "Alteration of *Talaromyces flavus* Heat Resistance by Growth Conditions and Heating Medium Composition," *J. Food Sci.*, vol. 55, no. 3, pp. 830–832, 1990.
- [19] A. R. Yates, A. Seaman, and M. Woodbine, "Growth of *Byssochlamys nivea* in various carbon dioxide atmospheres.," *Can. J. Microbiol.*, vol. 13, no. 8, pp. 1120–3, Aug. 1967.
- [20] J. A. N. Obeta and J. O. Ugwuanyi, "Shelf life study of some Nigerian fruit juices inoculated with ascospores of *Neosartorya* spp.," *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 50, no. 4, pp. 325–331, 1997.
- [21] L. R. Beuchat and G. D. Kuhn, "Thermal Sensitivity of *Neosartorya fischeri* Ascospores in Regular and Reduced-Sugar Grape Jelly.," *J. Food Prot.*, vol. 60, no. 12, pp. 1577–1579, Dec. 1997.
- [22] L. R. Beuchat, "Thermal tolerance of *Talaromyces flavus* ascospores as affected by growth medium and temperature, age and sugar content in the inactivation medium," *Trans. Br. Mycol. Soc.*, vol. 90, no. 3, pp. 359–364, Apr. 1988.
- [23] L. R. Beuchat, "Survival of *Neosartorya fischeri* and *Talaromyces flavus* ascospores in fruit powders," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 14, no. 6, pp. 238–240, 1992.
- [24] L. R. Beuchat and R. T. Toledo, "Behaviour of *Byssochlamys nivea* ascospores in fruit syrups," *Trans. Br. Mycol. Soc.*, vol. 68, no. 1, pp. 65–71, Feb. 1977.
- [25] V. Tournas and R. W. Traxler, "Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate," *J. Food Prot.*, vol. 57, no. 9, pp. 814–816, 1994.
- [26] A. DOUGLAS KING and W. U. HALBROOK, "Ascospore Heat Resistance and Control Measures for *Talaromyces flavus* Isolated From Fruit Juice Concentrate," *J. Food Sci.*, vol. 52, no. 5, pp. 1252–1254, 1987.
- [27] L. R. Beuchat, "Influence of organic acids on heat resistance characteristics of *Talaromyces flavus* ascospores," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 6, no. 2, pp. 97–105, 1988.

- [28] D. F. Splittstoesser and C. M. Splittstoesser, "Ascospores of *Byssoschlamys fulva* compared with those of a heat resistant *Aspergillus*," *J. Food Sci.*, vol. 42, no. 3, pp. 685–688, May 1977.
- [29] D. F. SPLITTSTOESSER and J. J. CHUREY, "Reduction of Heat Resistance of *Neosartorya fisheri* Ascospores by Sulfur Dioxide," *J. Food Sci.*, vol. 56, no. 3, pp. 876–877, 1991.
- [30] E. Rajashekhara, E. R. Suresh, and S. Ethiraj, "Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice," *Food Microbiol.*, vol. 17, no. 3, pp. 269–275, 2000.
- [31] J. Farkas, "Physical Methods of Food Preservation," in *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition*, American Society of Microbiology, 2014, pp. 685–712.
- [32] M. R. Adams and M. O. Moss, *Food Microbiology*. 2008.
- [33] M. J. Lewis and S. Jun, "Thermal Processing," in *Food Processing Handbook*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011, pp. 31–75.
- [34] R. A. Wilbey, "Heat Treatment of Foods: Principles of Pasteurization," in *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, Elsevier Inc., 2014, pp. 169–174.
- [35] F. V. M. Silva and P. A. Gibbs, "Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods," *Food Res. Int.*, vol. 45, no. 2, pp. 695–699, Mar. 2012.
- [36] J. Dijksterhuis and R. A. Samson, "Activation of ascospores by novel food preservation techniques.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 571, pp. 247–60, 2006.
- [37] "Food Protection with High Temperatures, and Characteristics of Thermophilic Microorganisms," in *Modern Food Microbiology*, Boston, MA: Springer US, pp. 415–441.
- [38] S. W. S. H. K. Fachmann,; *Food Composition and Nutrition Tables*. 2008.

Anexos

A - Carga microbiana associada aos binómios tempo/temperatura de ingredientação e pasteurização

Os dados das tabelas apresentadas neste anexo dizem respeito à carga microbiana associada aos binómios temperatura/tempo de ingredientação e pasteurização para cada preparado em estudo. Para tal, após o período de incubação, foi calculado o número de unidades formadoras de colónias em placa tendo em conta a diluição utilizada para cada ponto do tempo de pasteurização. É de realçar que, os valores obtidos para cada tempo de pasteurização resultaram da média da contagem de três réplicas feitas em duplicado. No entanto, em alguns pontos de amostragem estes valores não foram considerados de forma a obter o melhor ajuste das retas, representado pelo valor de R^2 , aquando da determinação de D (anexo B).

Por último, calculou-se o logaritmo de cada um desses valores bem como o logaritmo do desvio-padrão associado, de forma a se obterem os valores apresentados nas tabelas seguintes.

Tabela A1. Carga microbiana do preparado de amora açucarado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização aplicados

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	30 °C/1 h		30 °C/3 h	
		Média (log UFC/g)	Desvio-padrão	Média (log UFC/g)	Desvio-padrão
70	0	4.23	0.77	4.38	0.82
	1	-	-	4.30	0.77
	2	-	-	4.31	0.94
	3	4.19	0.76	4.28	0.98
	4	4.16	0.73	-	-
	5	4.15	0.53	4.24	0.70
80	0	3.87	1.11	4.50	1.01
	1	3.71	0.88	4.48	1.17
	2	3.74	0.79	4.52	1.02
	3	-	-	4.49	1.29
	4	3.55	1.20	4.42	0.69
	5	-	-	4.46	1.14
90	0	3.52	0.47	4.24	0.71
	1	3.18	0.74	3.63	1.35
	2	3.29	0.59	3.71	1.34
	3	3.04	0.81	3.46	1.19
	4	-	-	3.34	1.39
	5	-	-	-	-

Tabela A2. Carga microbiana do preparado de amora edulcorado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização aplicados

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	30 °C/1 h		30 °C/3 h	
		Média (log UFC/g)	Desvio-padrão	Média (log UFC/g)	Desvio-padrão
70	0	4.23	0.77	4.38	0.82
	1	-	-	4.30	0.77
	2	-	-	4.31	0.94
	3	4.19	0.76	4.28	0.98
	4	4.16	0.73	-	-
	5	4.15	0.53	4.24	0.70
80	0	3.87	1.11	4.50	1.01
	1	3.71	0.88	4.48	1.17
	2	3.74	0.79	4.52	1.02
	3	-	-	4.49	1.29
	4	3.55	1.20	4.42	0.69
	5	-	-	4.46	1.14
90	0	3.52	0.47	4.24	0.71
	1	3.18	0.74	3.63	1.35
	2	3.29	0.59	3.71	1.34
	3	3.04	0.81	3.46	1.19
	4	-	-	3.34	1.39
	5	-	-	-	-

Tabela A3. Carga microbiana do preparado de framboesa açucarado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização aplicados

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	30 °C/1 h		30 °C/3 h	
		Média (log UFC/g)	Desvio-padrão	Média (log UFC/g)	Desvio-padrão
70	0	4.30	0.80	4.20	0.99
	1	4.22	0.72	4.22	0.84
	2	4.23	0.57	4.22	0.71
	3	4.16	0.80	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	4.10	0.99
80	0	4.46	0.69	4.64	0.82
	1	-	-	-	-
	2	4.46	0.82	4.60	0.66
	3	4.42	0.58	4.56	0.69
	4	4.39	1.08	4.55	0.90
	5	4.38	0.87	-	-
90	0	3.68	0.98	4.57	1.32
	1	3.60	0.75	4.51	1.43
	2	3.58	0.66	4.09	0.72
	3	3.51	1.12	3.98	0.40
	4	3.51	1.10	3.95	0.50
	5	-	-	-	-

Tabela A4. Carga microbiana do preparado de framboesa edulcorado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização aplicados

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	30 °C/1 h		30 °C/3 h	
		Média (log UFC/g)	Desvio-padrão	Média (log UFC/g)	Desvio-padrão
70	0	4.57	0.85	4.56	0.89
	1	4.54	0.94	-	-
	2	-	-	-	-
	3	4.53	0.61	4.49	0.86
	4	-	-	4.49	1.01
	5	4.51	1.03	4.45	0.84
80	0	4.63	0.81	4.57	0.90
	1	4.62	0.79	-	-
	2	-	-	-	-
	3	4.60	0.82	4.50	1.04
	4	-	-	4.52	1.00
	5	4.57	1.06	4.47	0.80
90	0	4.67	1.10	4.73	1.06
	1	4.65	1.31	4.78	0.91
	2	-	-	4.73	0.57
	3	4.59	1.15	-	-
	4	-	-	4.46	1.11
	5	4.57	0.95	4.53	0.98

Tabela A5. Carga microbiana do preparado de mirtilo açucarado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização aplicados

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	30 °C/1 h		30 °C/3 h	
		Média (log UFC/g)	Desvio-padrão	Média (log UFC/g)	Desvio-padrão
70	0	-	-	4.52	0.61
	1	4.71	0.79	4.56	0.78
	2	4.66	1.14	4.52	1.06
	3	4.65	0.83	-	-
	4	4.62	1.32	-	-
	5	4.62	0.96	4.46	0.70
80	0	4.78	0.86	4.86	1.24
	1	4.64	1.19	4.86	1.24
	2	4.64	1.00	-	-
	3	4.68	1.09	4.88	0.90
	4	4.61	1.51	4.87	1.09
	5	-	-	4.89	1.35
90	0	-	-	4.95	1.20
	1	4.88	1.11	4.94	0.84
	2	4.86	0.95	4.90	1.05
	3	4.84	1.43	4.88	1.11
	4	4.79	1.54	4.84	1.11
	5	4.75	1.06	4.82	0.78

Tabela A6. Carga microbiana do preparado de mirtilo edulcorado, calculada através da média do logaritmo de UFC/g e respetivo desvio padrão, associados aos binómios de ingredientação, ao longo dos binómios de pasteurização aplicados

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min)	30 °C/1 h		30 °C/3 h	
		Média (log UFC/g)	Desvio-padrão	Média (log UFC/g)	Desvio-padrão
70	0	4.42	0.69	-	-
	1	4.44	0.92	4.17	0.65
	2	4.48	1.15	4.12	0.65
	3	4.48	1.03	4.09	0.44
	4	4.57	0.88	4.05	0.70
	5	4.47	0.05	-	-
80	0	4.21	0.74	4.26	0.62
	1	4.15	0.71	4.28	0.36
	2	4.19	0.36	4.18	0.92
	3	-	-	4.25	0.82
	4	4.06	1.06	-	-
	5	4.11	0.68	4.16	0.80
90	0	-	-	4.29	0.65
	1	4.09	0.36	4.26	0.69
	2	4.07	0.83	4.28	0.77
	3	4.05	0.72	4.25	0.81
	4	3.99	0.50	4.19	0.79
	5	3.92	0.23	4.14	0.87

B - Determinação dos parâmetros de morte térmica

Para determinar os parâmetros de cinética de inativação térmica (D e z) do microrganismo-alvo deste projeto, foi necessário recorrer aos valores dos ensaios microbiológicos apresentados do anexo A.

Para a determinação do valor de D dos diferentes preparados estudados (Tabelas B1, B2, B3, B4, B5 e B6) foi necessário elaborar inicialmente um gráfico das médias do logaritmo de UFC/g (eixo YY) em função dos tempos de pasteurização (eixo XX), para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização. Posteriormente, obtiveram-se as equações das retas, assim como as regressões lineares associadas, onde, através do inverso negativo do declive de cada reta foi possível determinar D.

Depois de obtidos os valores de D para os diferentes binómios de pasteurização, foi elaborado um gráfico do logaritmo dos valores de D (eixo XX) em função da temperatura de pasteurização (eixo YY), para cada binómio tempo/temperatura de ingredientação estudado. De igual forma, foi traçada uma reta de regressão linear para cada preparado, onde, com a equação da reta foi possível determinar z através do inverso negativo do declive. Estes valores encontram-se representados nas tabelas B7, B8, B9, B10, B11 e B12.

Tabela B1. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de amora açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Equação da reta	R^2	D (minutos)
30°C/ 1h	70 °C/ 5min	$y = - 0.016x + 4.230$	0.980	66.1
	80 °C/ 5min	$y = - 0.072x + 3.841$	0.872	13.9
	90 °C/ 5min	$y = - 0.133x + 3.457$	0.718	7.5
30°C/ 3h	70 °C/ 5min	$y = - 0.025x + 4.356$	0.845	40.0
	80 °C/ 5min	$y = - 0.012x + 4.508$	0.395	83.3
	90 °C/ 5min	$y = - 0.197x + 4.068$	0.809	5.1

Tabela B2. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de amora edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Equação da reta	R^2	D (minutos)
30°C/ 1h	70°C/ 5min	$y = 0.088x + 3.026$	0.816	-
	80°C/ 5min	$y = 0.097x + 3.157$	0.826	-
	90°C/ 5min	$y = -0.027x + 3.060$	0.541	37.0
30°C/ 3h	70°C/ 5min	$y = -0.015x + 4.133$	0.989	66.7
	80°C/ 5min	$y = -0.018x + 4.419$	0.992	55.6
	90°C/ 5min	$y = -0.039x + 3.233$	0.897	25.6

Tabela B3. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de framboesa açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Equação da reta	R^2	D (minutos)
30°C/ 1h	70°C/ 5min	$y = -0.011x + 4.562$	0.897	90.9
	80°C/ 5min	$y = -0.012x + 4.632$	0.989	83.3
	90°C/ 5min	$y = -0.022x + 4.669$	0.978	45.5
30°C/ 3h	70°C/ 5min	$y = -0.021x + 4.560$	0.957	47.6
	80°C/ 5min	$y = -0.018x + 4.569$	0.842	55.6
	90°C/ 5min	$y = -0.059x + 4.787$	0.765	16.9

Tabela B4. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de framboesa edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Equação da reta	R^2	D (minutos)
30°C/ 1h	70°C/ 5min	$y = -0.041x + 4.289$	0.851	24.4
	80°C/ 5min	$y = -0.018x + 4.475$	0.819	54.6
	90°C/ 5min	$y = -0.043x + 3.663$	0.935	23.3
30°C/ 3h	70°C/ 5min	$y = -0.023x + 4.231$	0.739	43.5
	80°C/ 5min	$y = -0.024x + 4.641$	0.970	41.7
	90°C/ 5min	$y = -0.178x + 4.575$	0.883	5.6

Tabela B5. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de mirtilo açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Equação da reta	R^2	D (minutos)
30°C/ 1h	70°C/ 5min	$y = 0.019x + 4.429$	0.435	-
	80°C/ 5min	$y = -0.024x + 4.201$	0.671	41.7
	90°C/ 5min	$y = -0.043x + 4.155$	0.918	23.3
30°C/ 3h	70°C/ 5min	$y = -0.039x + 4.205$	0.991	25.6
	80°C/ 5min	$y = -0.020x + 4.270$	0.521	50.0
	90°C/ 5min	$y = -0.028x + 4.306$	0.826	35.7

Tabela B6. Cálculos intermédios para a determinação de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de mirtilo edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Equação da reta	R^2	D (minutos)
30°C/ 1h	70°C/ 5min	$y = -0.022x + 4.718$	0.883	45.5
	80°C/ 5min	$y = -0.030x + 4.730$	0.511	33.3
	90°C/ 5min	$y = -0.031x + 4.917$	0.965	32.2
30°C/ 3h	70°C/ 5min	$y = -0.016x + 4.547$	0.670	63.3
	80°C/ 5min	$y = 0.006x + 4.856$	0.651	-
	90°C/ 5min	$y = -0.028x + 4.960$	0.983	36.0

Tabela B7. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de amora açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Log D	Equação da reta	R^2	z (°C)
30°C/ 1h	70°C/ 5min	1.820	$y = -0.046x + 4.951$	0.944	21.7
	80°C/ 5min	1.143			
	90°C/ 5min	0.875			
30°C/ 3h	70°C/ 5min	1.602	$y = -0.045x + 4.996$	0.506	22.2
	80°C/ 5min	1.921			
	90°C/ 5min	0.708			

Tabela B8. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de amora edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Log D	Equação da reta	R ²	z (°C)
30°C/ 1h	70°C/ 5min	-	-	-	-
	80°C/ 5min	-			
	90°C/ 5min	1.568			
30°C/ 3h	70°C/ 5min	1.824	$y = -0.021x + 3.319$	0.887	47.6
	80°C/ 5min	1.745			
	90°C/ 5min	1.408			

Tabela B9. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de framboesa açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Log D	Equação da reta	R ²	z (°C)
30°C/ 1h	70°C/ 5min	1.959	$y = -0.015x + 3.050$	0.843	66.7
	80°C/ 5min	1.921			
	90°C/ 5min	1.658			
30°C/ 3h	70°C/ 5min	1.678	$y = -0.022x + 3.345$	0.640	45.5
	80°C/ 5min	1.745			
	90°C/ 5min	1.228			

Tabela B10. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de framboesa edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Log D	Equação da reta	R ²	z (°C)
30°C/ 1h	70°C/ 5min	-	$y = -0.001x + 1.580$	1.000	1000.0
	80°C/ 5min	1.737			
	90°C/ 5min	1.367			
30°C/ 3h	70°C/ 5min	1.638	$y = -0.044x + 4.891$	0.766	22.7
	80°C/ 5min	1.620			
	90°C/ 5min	0.750			

Tabela B11. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de mirtilo açucarado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Log D	Equação da reta	R ²	z (°C)
30°C/ 1h	70°C/ 5min	-	$y = -0.025x + 3.646$	1.000	40.0
	80°C/ 5min	1.620			
	90°C/ 5min	1.367			
30°C/ 3h	70°C/ 5min	1.409	$y = -0.007x + 0.978$	0.246	-
	80°C/ 5min	1.699			
	90°C/ 5min	1.553			

Tabela B12. Cálculos intermédios para a determinação de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização do preparado de mirtilo edulcorado, acompanhado das equações das retas e regressões correspondentes

Binómio de ingredientação	Binómio de pasteurização	Log D	Equação da reta	R ²	z (°C)
30°C/ 1h	70°C/ 5min	1.658	$y = -0.008x + 2.164$	0.827	125.0
	80°C/ 5min	1.523			
	90°C/ 5min	1.507			
30°C/ 3h	70°C/ 5min	1.801	$y = -0.012x + 2.660$	1.000	83.3
	80°C/ 5min	-			
	90°C/ 5min	1.556			

C - Valores do teste ANOVA Fator Único

Para cada preparado foram testadas se existiam diferenças estatísticas entre os binómios de ingredientação utilizados, para o mesmo binómio de pasteurização, através do teste ANOVA *Fator Único* com um nível de significância de 0.05. Através da análise das Tabelas C1, C2, C3, C4, C5 e C6 é possível observar que apenas se revelaram significativos os valores do binómios de pasteurização 70°C /5 min e 80°C/ 5 min dos preparados de amora açucarado e mirtilo edulcorado, o binómio de pasteurização 70°C/ 5 min do preparado de amora edulcorado, o binómio de pasteurização 80°C/ 5 min do preparado de framboesa açucarado, os binómios de pasteurização 80°C/ 5 min e 90°C/ 5 min do preparado de

framboesa edulcorado, e os binômios de pasteurização 70°C/ 5 min e 90°C/5 min do preparado de mirtilo açucarado, uma vez que nesses casos $\rho < 0.05$ e $F > F_{\text{critico}}$.

Tabela C1. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binômios de ingredientação do preparado de amora açucarado

Binómio de pasteurização	ρ	F	F critico
70°C/ 5 min	0.005	15.475	5.591
80°C/ 5 min	7.150×10^{-5}	191.763	5.318
90°C/ 5 min	0.071	4.509	5.591

Tabela C2. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binômios de ingredientação do preparado de amora edulcorado

Binómio de pasteurização	ρ	F	F critico
70°C/ 5 min	1.56×10^{-5}	84.815	5.318
80°C/ 5 min	0.607	0.281	4.965
90°C/ 5 min	0.068	4.665	5.591

Tabela C3. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binômios de ingredientação do preparado de framboesa açucarado

Binómio de pasteurização	ρ	F	F critico
70°C/ 5 min	0.176	2.356	5.987
80°C/ 5 min	0.011	13.135	5.987
90°C/ 5 min	0.738	0.121	5.591

Tabela C4. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binômios de ingredientação do preparado de framboesa edulcorado

Binómio de pasteurização	ρ	F	F crítico
70°C/ 5 min	0.335	1.096	5.987
80°C/ 5 min	0.000	39.616	5.591
90°C/ 5 min	0.001	22.171	5.318

Tabela C5. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binômios de ingredientação do preparado de mirtilo açucarado

Binómio de pasteurização	ρ	F	F crítico
70°C/ 5 min	3.72×10^{-6}	124.553	5.318
80°C/ 5 min	0.052	5.204	5.318
90°C/ 5 min	0.000	30.296	5.117

Tabela C6. Resultados do teste “Anova: fator único” entre os diferentes binômios de ingredientação do preparado de mirtilo edulcorado

Binómio de pasteurização	ρ	F	F crítico
70°C/ 5 min	0.001	27.596	5.591
80°C/ 5 min	0.000	44.643	5.318
90°C/ 5 min	0.075	4.063	5.117