



Catarina Isabel Castro de Almeida

Licenciada em Ciências da Nutrição

**Validação do prazo de validade de
sobremesas prontas a consumir ao longo do
tempo de armazenamento**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora
Auxiliar, FCT/UNL

Coorientadora: Engenheira Carla Almeida, Diretora de Investigação e
Desenvolvimento, Condi Alimentar S.A.

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando

Arguente: Prof. Doutora Elisabete Muchagato Maurício

Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

março de 2020

Catarina Isabel Castro de Almeida

Licenciada em Ciências da Nutrição



**Validação do prazo de validade de
sobremesas prontas a consumir ao longo do
tempo de armazenamento**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora
Auxiliar, FCT/UNL
Coorientadora: Engenheira Carla Almeida, Diretora de Investigação e
Desenvolvimento, Condi Alimentar S.A.

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando
Arguente: Prof. Doutora Elisabete Muchagato Maurício
Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

março de 2020

Validação do prazo de validade de sobremesas prontas a consumir ao longo do tempo de armazenamento

Copyright © Catarina Isabel Castro de Almeida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor

Agradecimentos

Não seria possível concluir com tanto sucesso o meu período de estágio sem a ajuda, companheirismo, força e conhecimento da Engenheira Ângela Batista. O mesmo se aplica à minha coorientadora, Engenheira Carla Almeida, que me recebeu de braços abertos na empresa, sempre com um sorriso e uma palavra de motivação. A concretização do meu estágio seria inexecutável sem o aval da empresa Condi Alimentar S.A.

Quero agradecer especialmente à minha orientadora Professora Paula Duarte, pela sua pronta disponibilidade, apoio, dedicação e troca incessante de conhecimentos.

Quero igualmente agradecer aos meus pais pelo apoio incondicional, força e motivação, mesmo nos momentos mais árduos.

Por fim, mas não por último, agradeço ao meu namorado António Pedro Leite pela sua presença, apoio e dedicação.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo a análise química, física, microbiológica e organolética, de amostras de sobremesas prontas para consumo, nomeadamente de gelatinas com açúcar (gelatina de morango) , gelatinas zero (gelatina de tangerina) e pudins zero (pudim de chocolate), ao longo do seu tempo de armazenamento, de forma a validar o tempo de prateleira de 4 meses para as gelatinas e de 2 meses para os pudins.

Todas as amostras foram preparadas em laboratório e para esse efeito foram desenvolvidos três diferentes métodos de preparação (Métodos I, II e III). Os métodos testados diferenciaram-se, essencialmente, no tempo de aquecimento das amostras e na temperatura de selagem das embalagens. No Método I as embalagens foram seladas quando o produto atingiu uma temperatura de 18 °C. No Método II as embalagens foram seladas imediatamente após fervura das amostras. No Método III, as embalagens foram seladas com o produto a uma temperatura entre os 20 e os 25 °C. Ao longo do tempo de armazenamento, as amostras foram sujeitas a análises físico-químicas (cor e pH), análise sensorial (avaliação do aspeto, cor, consistência/textura, sabor, doçura e acidez), análise microbiológica (microrganismos mesófilos totais a 30 °C, bolores e leveduras, microrganismos psicotróficos e *Enterobacteriaceae*) e ainda à pesquisa de alergénios (glúten).

Foi possível validar a ausência de glúten em todas as amostras. O modo de preparação de amostras que se mostrou mais bem-sucedido do ponto de vista da estabilidade microbiológica foi o Método II. No entanto, a validação do tempo de vida útil de 4 meses (16 semanas) apenas foi alcançada para a gelatina de morango da gama com açúcar, preparada de acordo com o Método II, uma vez que, no caso da gelatina zero de tangerina, este método originou uma deterioração das suas características organoléticas. No caso das amostras de pudim, nenhum dos métodos testados se revelou eficaz para garantir a ausência de desenvolvimento de microrganismos durante o armazenamento das amostras.

Palavras Chave: Sobremesas prontas a consumir, Conservação, Análise microbiológica, Cor, Análise sensorial

Abstract

This work's purpose was to perform chemical, physical, microbiological and organoleptic analysis of ready-to-eat samples, sugared gelatin (strawberry flavor) and non-sugared gelatin and pudding (tangerine and chocolate flavors, respectively), over time, in order to make 4 and 2-month's shelf life validation for gelatins and puddings, respectively.

All the samples were prepared in a laboratory and for that matter were developed three different preparation methods (Method I, II and III). These methods were different among themselves essentially on sample's heating time and sample's sealing temperature. In Method I the packages were sealed when the product reached 18°C. In Method II the packages were sealed immediately after the samples boiled. In Method III the samples were sealed when the product reached the temperature between 20 and 25 °C. Over the storage period the samples were subjected to physical and chemical analysis (color and pH), sensory analysis (appearance, color, consistency/texture, flavor, sweetness and acidity evaluations), microbiological analysis (total mesophilic microorganisms at 30°C, molds and yeasts, psychotropic microorganisms and *Enterobacteriaceae*) and allergen research (gluten).

It was possible to validate the absence of gluten in all the samples. The most successful sample preparation method, from the microbiological stability point of view was Method II. However, 4 months' (16 weeks) shelf life validation was only achieved for strawberry gelatin from the sugared range, prepared according to Method II, since this method applied to tangerine gelatin samples caused deterioration of its organoleptic characteristics. On the pudding analysis, none of the tested methods proved to be effective in ensuring the absence of microorganism's development during storage.

Key words: Ready-to-eat desserts, Conservation, Microbiological Analyses, Color, Sensory Analyses

Lista de Abreviaturas

DDA – *Doses Diárias Admissíveis*

DRBC Agar - *Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol Agar*

FDA – *Food and Drug Administration*

I&D - *Investigação e Desenvolvimento*

IFS Food - *International Featured Standard Food*

INSA – *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge*

HACCP – *Sistema de Identificação de Perigos e Pontos Críticos de Controlo*

HDPE – *Polietileno de Alta Densidade*

PC - *Polycarbonato*

PCA – *Plate Count Agar*

PET - *Politereftalato de Etileno*

PP – *Polipropileno*

PS – *Poliestireno*

PVDC – *Policloreto de Vinilideno*

SGS - *Société Générale de Surveillance*

UFC – *Unidades Formadoras de Colónias*

VRBG Agar - *Violet Red Bile Glucose Agar*

ΔE – *Variação Total de Cor*

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Caracterização da Empresa.....	1
1.2. Enquadramento e objetivo	1
1.3. Revisão da Literatura – Sobremesas Prontas e os seus constituintes.....	2
1.3.1. Gelatina	2
1.3.2. Pudins	8
1.3.3. Tempo de Prateleira e fatores que afetam a aceitação de um produto alimentar ..10	
1.3.3.1. Parâmetros Físico-Químicos.....	11
1.3.3.2. Parâmetros Microbiológicos.....	12
1.3.3.3. Parâmetros Organoléticos – Análise Sensorial	14
1.3.4. Fatores Extrínsecos e a sua influência nos produtos prontos para consumo.....	15
1.3.5. Testes de Aceleração para determinação do tempo de prateleira.....	16
2. Materiais e Métodos.....	18
2.1. Gelatinas Prontas	20
2.1.1. Gelatinas preparadas de acordo com o Método I	20
2.1.2. Gelatinas preparadas de acordo com o Método II	21
2.1.3. Gelatinas preparadas de acordo com o Método III	21
2.2. Pudins Prontos	22
2.2.1. Pudins preparados de acordo com o Método I	22
2.2.2. Pudins preparados de acordo com o Método II	23
2.2.3. Pudins preparados de acordo com o Método III	23
2.2.3.1. Pudim de Chocolate Formulação A.....	24
2.2.3.2. Pudim de Chocolate Formulação B.....	24
2.3. Parâmetros de Segurança e Qualidade	25
2.3.1. Determinação do pH.....	25
2.3.2. Determinação da Cor.....	25
2.3.3. Pesquisa de Glúten	25
2.4. Análise Microbiológica	27
2.3.4.1. Contagem de Microrganismos Aeróbios Totais a 30 °C	28
2.3.4.2. Contagem de Microrganismos Psicrotróficos.....	28
2.3.4.3. Contagem de Bolores e Leveduras	29
2.3.4.4. Contagem de Enterobacteriaceae	30
2.4. Análise Sensorial.....	31
2.5. Análise Estatística de Dados	32
3. Resultados e Discussão.....	33
3.1. Análises de estabilidade das sobremesas preparadas de acordo o Método I	33
3.1.1. Gelatinas Prontas	33
3.1.2. Pudins Prontos	36

3.2. Análises de estabilidade das sobremesas preparadas de acordo com o Método II..	40
3.2.1. Gelatina de Tangerina da Gama Zero	40
3.2.2. Gelatina de Morango da Gama com Açúcar	46
3.2.3. Pudim de Chocolate da Gama Zero.....	52
3.3. Análises de estabilidade das sobremesas preparadas de acordo com o Método III.	57
3.3.1. Gelatina de Tangerina da Gama Zero	57
3.3.2. Pudins de Chocolate da Gama Zero Formulações A e B.....	60
4. Considerações Finais.....	62
5. Referências Bibliográficas	64
Anexo I	70

1. Introdução

1.1. Caracterização da Empresa

A Condi Alimentar S.A. é uma empresa portuguesa de cariz familiar, fundada em 1991 tendo por isso mais de 25 anos de experiência. A sua missão centra-se em desenvolver produtos inovadores e deliciosos sem esquecer o lado saudável. Foi a primeira empresa a lançar em Portugal a gama de gelatinas sem açúcar, sendo líder de mercado neste segmento. Atualmente, é uma das principais e mais inovadoras marcas no mercado das sobremesas em pó, produzindo gelatinas, preparados para bolos, mousses e pudins, entre muitos outros. A marca lançou ainda as primeiras sobremesas em pó biológicas oferecendo assim mais opções aos consumidores.

Os responsáveis pelo desenvolvimento de novos produtos pertencem à equipa de Investigação e Desenvolvimento (I&D) que se foca no desenvolvimento de novas formulações e de melhorias contínuas. As novas fórmulas são sempre sujeitas a validação prévia através de provas sensoriais por parte do painel de provadores.

A empresa apresenta uma série de certificações nomeadamente a Certificação *International Featured Standard (IFS) Food* e o Sistema de Certificação de Segurança Alimentar NP EN ISO 22000:2005 pela empresa *Société Générale de Surveillance (SGS)*.

1.2. Enquadramento e objetivo

Com o passar dos anos as indústrias têm vindo a enfrentar vários desafios provenientes das oscilações contínuas nas exigências dos consumidores e fornecedores. Este desafio é ainda mais importante para a indústria alimentar, considerada uma das mais relevantes para o setor económico decorrente. É neste segmento que o nível de variabilidade é mais notório em termos de exigência, volume, processamento, comportamento do consumidor e atitude dos fornecedores. Os gostos variam de pessoa para pessoa e, comer e beber são ações cada vez mais individualizadas o que significa que a produção irá ser adaptada às exigências de cada consumidor (Demartini et al., 2018).

Atualmente vivemos num mundo que aspira a ser instantâneo, movido por ações de efeito imediato. É um facto que o tempo de lazer individual é cada vez menor, devido

às rotinas aceleradas e aos horários laborais pouco flexíveis. Assim, a procura por refeições rápidas, fáceis e saudáveis é cada vez maior por parte dos consumidores, o que implica um consequente investimento pelas indústrias alimentares no desenvolvimento de produtos alimentares prontos a comer e com poucas calorias. Consequentemente, surge uma pressão por parte do governo, profissionais de saúde e das grandes superfícies comerciais, sobre a indústria alimentar, para que reduzam o conteúdo calórico, proveniente do açúcar, em alimentos processados (Alija & Talens, 2013).

Na procura de continuar a desenvolver produtos diversificados, capazes de responder às novas exigências que o mercado vai colocando, a Condi decidiu alargar a sua gama de produtos e passar a produzir, além dos preparados em pó, sobremesas totalmente prontas a consumir. Esta nova gama incluiu sobremesas de baixo valor calórico, nomeadamente gelatinas e pudins, e também gelatinas açucaradas. O desenvolvimento desta nova gama de produtos trouxe, no entanto, desafios adicionais que se prenderam com a sua conservação, dado os produtos prontos a consumir serem mais suscetíveis à contaminação microbiológica do que os produtos desidratados.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a análise química, física, microbiológica e organolética ao longo do tempo de prateleira, de sobremesas prontas para consumo, nomeadamente de gelatinas com açúcar e de gelatinas e pudins sem açúcar, preparadas de diferentes modos, com vista à identificação dos métodos de preparação, que permitissem estabelecer prazos de validade de 4 meses para as gelatinas e de 2 meses para os pudins.

1.3. Revisão da Literatura – Sobremesas Prontas e os seus constituintes

1.3.1. Gelatina

A sobremesa tradicionalmente conhecida por gelatina é, por norma, constituída por água, ingrediente maioritário, açúcar ($\approx 13,0\%$) ou adoçantes (sucralose e acessulfame K) ($\approx 0,001\%$), gelatina de origem animal ou vegetal ($1,7\text{-}1,9\%$), reguladores de acidez (ácido cítrico, ácido fumárico e citratos de sódio), aromas, corantes (curcumina, antocianinas, complexos cúpricos de clorofilinas, etc.) e sal. Algumas destas gelatinas podem ser enriquecidas com vitaminas antioxidantes como, por exemplo, o ácido ascórbico. Para a sua confeção e preparação é necessário adicionar água, obtendo-se assim uma substância translúcida que após refrigeração adquire a sua forma característica.

Há mais de 2000 anos que os tecidos conjuntivos e produtos extraídos de animais têm vindo a ser utilizados pela indústria alimentar devido às suas propriedades gelificantes. À medida que o conhecimento sobre aminoácidos e proteínas, particularmente sobre o colagénio e gelatina, foi aumentando tornou-se possível manufaturar gelatina microbiologicamente segura e de acordo com as especificações da legislação em vigor. A gelatina é um hidrocolóide ou polímero hidrossolúvel, utilizado para gelificar, espessar e estabilizar géneros alimentícios. A gelatina destaca-se dos restantes hidrocolóides, nomeadamente dos carragenanos ou pectinas, uma vez que se trata de uma proteína. Por definição, a gelatina é um polipeptídeo de alto peso molecular derivado do colagénio. Os cinco maiores grupos de aplicação da gelatina são as sobremesas de gelatina, produtos lácteos, produtos à base de carne, bebidas e o grupo dos molhos e sopas (Benjakul et al., 2018; Kamal et al., 2018; Poppe, 2000).

O colagénio é uma proteína estrutural, que se encontra amplamente distribuída por vários tecidos, tais como, o tecido ósseo, cartilaginoso e conjuntivo dos animais vertebrados. Devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, o colagénio é um biomaterial muito explorado pelas indústrias cosmética, farmacêutica, biomédica e alimentar. O colagénio é composto por três cadeias polipeptídicas enroladas em tripla hélice, onde cada cadeia contém aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos. A sua estrutura é estabilizada pela repetição de três aminoácidos, a glicina, a prolina e a hidroxiprolina. A glicina está localizada no centro da tripla hélice, não interagindo com nenhum dos outros aminoácidos, formando assim uma estrutura estável sem repulsões (Madrid, et al., 1994; Aberoumand, 2012).

A gelatina é uma substância obtida através da desnaturação térmica do colagénio. O processamento do colagénio para obtenção de gelatina animal passa por operações de secagem, limpeza e desengorduramento. Para dar início ao processamento dos ossos e cartilagens animais, maioritariamente das espécies bovina e suína, estes são submetidos a tratamentos com substâncias alcalinas ou ácidas, o que resulta na formação de gelatinas alcalinas e ácidas, respetivamente. Posteriormente, o produto obtido é transportado para tanques de cozimento, onde se efetuam extrações sequenciais à medida que se aumenta a temperatura. Nesta fase, o produto é filtrado e concentrado a baixas temperaturas. Antes da última evaporação, os caldos de gelatina são esterilizados a 120 °C. Por fim, o caldo resultante é seco em túneis apropriados até se proceder à moagem e embalamento do produto final. Todo o processo de fabricação de gelatina é realizado de acordo com critérios de higienização apropriados e estritos, sendo, igualmente, efetuados controlos físico-químicos e microbiológicos para garantir a segurança e salubridade do produto final (Madrid et al., 1994).

Devido ao facto de colagénio ser uma proteína de origem animal, mais concretamente originária de animais terrestres, têm surgido conflitos éticos e religiosos, assim como complicações relativas à regulamentação. Em alternativa, o interesse pela pesquisa de novas fontes de colagénio tem aumentado exponencialmente, surgindo como particularmente promissoras as fontes de origem marítima, nomeadamente os peixes e as algas (Aberoumand, 2012).

No regulamento (EU) N°1129/2011 estão previstos todos os aditivos alimentares aprovados para utilização em géneros alimentícios, particularmente no grupo das sobremesas, assim como as suas condições de utilização. O consumo de aditivos alimentares em quantidades inferiores às Doses Diárias Admissíveis (DDA) estabelecidas, e a sua utilização nas condições regulamentadas não apresenta problemas para a saúde do consumidor. No entanto, deve ser tido em conta que apesar da avaliação toxicológica que tem vindo a ser efetuada, existe sempre um risco associado à sua ingestão. A extrapolação para o homem de dados obtidos em estudos efetuados em animais, assim como o crescente número de alimentos nos quais estão presentes estes aditivos, são aspetos que acentuam a necessidade de estudos sobre os efeitos cumulativos destes produtos e da sua interação nos seres humanos (European Parliament, 2011; Milani & Maleki 2012).

Cada aditivo alimentar corresponde a um código constituído pela letra **E**, que deriva da palavra Europa, seguida de três ou quatro algarismos, sendo o mesmo válido para todos os países da União Europeia. Os aditivos alimentares podem ser agrupados em três diferentes grupos (Madrid, et al., 1994; Lidon & Silvestre, 2007; Adami, 2016):

- Aditivos que melhoram o aspeto e/ou as características físicas dos alimentos: Emulsionantes, estabilizantes, espessantes, agentes aglutinantes, gelificantes, agentes emulsionantes, agentes humectantes, agentes espumantes e fermentos químicos;
- Aditivos que conservam os alimentos: Conservantes, antioxidantes, acidulantes e reguladores de acidez;
- Aditivos capazes de alterar as propriedades organoléticas dos alimentos: Corantes, edulcorantes, aromatizantes, potenciadores de sabor e estabilizantes da cor.

As sobremesas de gelatina que pertencem à gama com açúcar são adoçadas através da adição de um ingrediente há muito utilizado pela indústria alimentar, a sacarose. A sacarose, ou açúcar comum, é obtida industrialmente a partir da cana-de-açúcar ou da beterraba. A glucose ou dextrose é o açúcar presente na fécula, refinado e

cristalizado. Não obstante, o poder edulcorante da sacarose é maior do que o da glucose, sendo por isso a primeira mais utilizada pela indústria alimentar (Madrid et al., 1994).

Existem várias formas de modificar formulações e receitas tradicionais em versões menos calóricas, nomeadamente ao reduzir o seu teor em açúcar ou através da utilização de ingredientes que mimetizam a sua função. Em alternativa à adição de sacarose, as gelatinas comercializadas pertencentes à gama zero ou *light*, são adoçadas com a adição de edulcorantes.

Os edulcorantes são substâncias de sabor doce que substituem o açúcar. Estas substâncias, por serem utilizadas em quantidades pequenas ou por que não são metabolizadas pelo organismo, têm um aporte calórico considerado insignificante. Desde a descoberta da síntese da sacarina, têm vindo a ser desenvolvidos progressivamente mais adoçantes não nutritivos. Este processo não é simples, uma vez que a relação entre a estrutura e o sabor doce não é bem conhecida, assim como não é fácil conseguir adoçantes mais eficientes e que não tenham efeitos secundários prejudiciais à saúde. Os edulcorantes podem ser classificados como naturais, como por exemplo a *Stevia*, ou como artificiais, nomeadamente a sacarina, sucralose, aspartame, ciclamato e acessulfame k (Lidon & Silvestre, 2007; Alija & Talens, 2013; Adami, 2016).

O acessulfame k (E950) é utilizado como edulcorante de mesa e na generalidade dos géneros alimentícios doces, mas de baixo valor energético, por norma classificados como *light* ou zero. De entre os géneros alimentícios aos quais é adicionado, destacam-se os refrigerantes, sobremesas, produtos lácteos, compotas, doces e geleias, cerveja, sopas, produtos de confeitaria, pastelaria e padaria, entre muitos outros. A sua fórmula molecular é 200 vezes mais doce que a da sacarose. Não estão descritos efeitos secundários para a sua utilização. Não obstante a sua DDA recomendada é de 9,0 mg/kg/dia e o seu limite máximo permitido por 100 g de gelatina ou pudim é de 0,035 g (Lidon & Silvestre, 2007; Comissão Europeia, 2001; Comissão Europeia, 2011).

A sucralose (E955) é uma substância que apresenta um poder adoçante 600 vezes maior do que o da sacarose e apresenta-se normalmente sob a forma de pó cristalino, inodoro e de cor branca. A sua utilização é vantajosa, quando comparada com outros edulcorantes, devido à sua elevada solubilidade em água, à sua estabilidade a temperaturas altas e baixas e ao facto de não ser metabolizada pelo organismo humano. Atendendo à sua versatilidade, a sucralose é adicionada a inúmeros géneros alimentícios, nomeadamente a sobremesas, produtos de confeitaria, leite, frutos secos ou gorduras, pastilhas, cervejas, gelados, compotas, geleias e marmeladas, preparados de frutas, entre muitos outros. A sua DDA é de 5,0 mg/kg/dia e, atendendo ao

regulamento (EU) Nº1129/2011, o seu limite máximo permitido por 100 g de gelatina ou pudim é de 0,04 g (Lidon & Silvestre, 2007; Comissão Europeia, 2011).

O ácido fumárico (E297), classificado como regulador de acidez ou acidulante, é uma substância amplamente utilizada em sobremesas e produtos com adição de açúcar. Este ácido é utilizado pela indústria alimentar como fonte ideal de acidez. A quantidade máxima específica permitida em sobremesas em pó, sobremesas de gelatina e em sobremesas com adição de frutas é de 4000 mg/kg. Ademais, a DDA para este ácido é de 6 mg/kg de peso corporal/dia (Fiorucci et al., 2002; Wood et al., 2004).

Os antioxidantes são substâncias que protegem os géneros alimentícios da deterioração por processos de oxidação, aumentando assim o seu tempo de vida útil. Os antioxidantes atrasam a oxidação, mas não a impedem totalmente, sendo que a sua ação pode eventualmente saturar. A utilização de vários antioxidantes em simultâneo torna-se importante de forma a obter uma ação sinérgica. O ácido ascórbico (E300), conhecido como vitamina C, para além de ser um agente nutricional natural é igualmente adicionado às formulações de géneros alimentícios não lipídicos com o intuito de prevenir reações de escurecimento enzimático e aumentar o seu tempo de vida útil. O papel do ácido ascórbico é regenerar temporariamente as quinonas de volta aos fenóis originais numa reação de oxidação-redução observando-se o aumento de ácido desidroascórbico e de outros produtos de degradação. A retenção do ácido ascórbico varia consoante vários fatores ambientais, nomeadamente a presença de oxigénio, de iões metálicos, de enzimas e açúcares, assim como também já se observou a sua degradação em anaerobiose durante processamentos a quente (Lidon & Silvestre 2007; Louarme & Billaud, 2012).

São considerados antioxidantes sinérgicos as substâncias que reforçam a ação dos verdadeiros antioxidantes. O ácido cítrico (E330), classificado como um antioxidante sinérgico, é produzido através da fermentação aeróbia da sacarose ou da dextrose. Este ácido é utilizado em formulações de gelatina e em alimentos como geleias, doces, frutas em calda, caramelos, sumos de fruta, gelados, néctares e refrigerantes, produtos lácteos, produtos hortícolas, algumas manteigas, margarinas, peixes, moluscos, batatas descascadas, produtos de peixe congelado e alimentos para bebé. O ácido cítrico forma quelatos estáveis com metais pró-oxidantes e é também utilizado como regulador de acidez. A sua vasta utilização deve-se à sua alta solubilidade e ao seu efeito tampão proporcionando estabilidade aos produtos finais. Este ácido não apresenta uma quantidade máxima pré-estabelecida, sendo categorizado como *quantum satis* (Adami, 2016; Comissão Europeia, 2011).

Os corantes são substâncias que quando adicionadas aos alimentos proporcionam, reforçam ou fazem variar a sua cor. Estas substâncias têm vindo a ser

amplamente utilizadas, sendo que em tempos mais remotos se recorria maioritariamente a corantes de origem natural, extraídos de plantas ou a corantes minerais. Atualmente, as indústrias utilizam igualmente corantes artificiais ou sintéticos obtidos através de procedimentos de síntese química. Os corantes artificiais são mais procurados devido às suas excelentes propriedades, como, por exemplo, o facto de proporcionarem uma coloração mais resistente, mais variada e uniforme e com a intensidade que se pretende. O processamento alimentar pode causar a degradação de pigmentos naturais existentes nos alimentos tornando-se necessária a adição de corantes alimentares mais resistentes (Lidon & Silvestre, 2007; Adami, 2016).

O corante de curcumina (E100) é obtido a partir do rizoma da planta *Curcuma longa* L., cultivada na Índia. Este corante é utilizado para conferir a cor amarela/alaranjada aos alimentos. Este aditivo é utilizado na generalidade dos produtos alimentares, nomeadamente em mostardas, gelatinas, geleias, caril, paelhas, produtos lácteos aromatizados, refrigerantes e outros alimentos em que se pretenda observar a coloração amarela ou alaranjada (Lidon & Silvestre, 2007).

As antocianinas (E163) são pigmentos naturais, derivados de plantas e solúveis em água. Estes pigmentos são responsáveis pela atribuição de tonalidades compreendidas entre o vermelho e o azul em muitas frutas, legumes e hortaliças. A principal desvantagem associada à utilização destes pigmentos, reside no facto da sua coloração ser muito sensível a alterações de pH, que podem acontecer devido às reações químicas que ocorrem nos produtos alimentícios (Lopes et al., 2007).

Aa clorofilas são pigmentos responsáveis pela atribuição da cor verde das folhas, plantas e dos frutos não maduros. São fundamentais ao processo de fotossíntese e, por esta razão, têm sido extensivamente estudadas. Estas complexas moléculas têm incluído no seu interior um átomo de magnésio. As clorofilinas consistem em derivados mais simples das clorofilas, obtidos por rutura parcial da sua estrutura. As clorofilas e clorofilinas (E140), assim como os complexos cúpricos de clorofilas e de clorofilinas (E141), são corantes naturais amplamente utilizados pela indústria alimentar para conferir aos produtos cores, que variam entre o verde azeitona, verde escuro, azul esverdeado e o azul escuro. As clorofilas são sensíveis à luz, alterações de pH e ao calor. O aquecimento de alimentos conduz à alteração da sua cor devido à degradação da clorofila. Nesta degradação, dá-se a perda do átomo de magnésio e observa-se a formação de feofitinas. A instabilidade observada nas clorofilas faz com que sejam aditivos alimentares pouco utilizados e que, em substituição, se recorra aos complexos cúpricos de clorofilas e clorofilinas. Estes derivados resultam da substituição do átomo de magnésio por um átomo de cobre, o que dá origem à perpetuação de uma cor muito mais estável. Estes corantes (E140 e E141) podem ser utilizados na generalidade dos

produtos alimentares, nomeadamente nos frutos naturalmente verdes, produtos hortícolas, sobremesas, gelados, pastilhas elásticas, produtos de confeitaria entre muitos outros (Lidon & Silvestre, 2007).

Atendendo ao Regulamento (CE) Nº1129/2011, o corante de curcumina é classificado como um corante alimentar com um teor máximo em combinação, sendo que para o grupo das sobremesas, onde se incluem as gelatinas e pudins, o seu teor máximo de adição é de 150 mg/kg ou mg/L de produto. Quanto aos corantes antocianina e clorofilas e derivados, a sua adição deve ser de acordo com o princípio *quantum satis* (Comissão Europeia, 2011; Lopes et al., 2007).

1.3.2. Pudins

As sobremesas lácteas são consumidas diariamente por diferentes grupos de consumidores em todo o mundo. Os pudins, de uma maneira redundante, são considerados pastas à base de amido e de proteínas lácteas. Estes podem ser descritos como suspensões de partículas deformáveis (grânulos de amido) dispersas num meio contínuo constituído por proteínas do leite e agentes gelificantes (carragenanos) (Alamprese & Mariotti, 2011).

Por norma, os pudins possuem na sua constituição cinco ingredientes principais: água, leite e derivados, amidos, gordura, modificadores de textura e/ou estabilizantes (carragenina e goma de farinha de alfarroba), assim como aromas (chocolate e baunilha), corantes (betacaroteno e curcumina), sal e açúcar ou edulcorantes (sucralose e acessulfame K), podendo estes variar consoante a finalidade e/ou gama do produto final (Alamprese & Mariotti, 2011; Ares et al., 2012).

Tanto os aromas como os corantes adicionados às formulações dos pudins constituem a chave diferenciadora do produto final. Os aromas tradicionalmente utilizados são o de chocolate, baunilha, caramelo e morango. O aroma de chocolate não está naturalmente presente nos grãos de cacau, este resulta de uma sucessão de processos tecnológicos que se incluem com a fermentação pós colheita dos grãos e a torrefação. Com efeito, a cor castanha do chocolate e do cacau em pó em bruto deve-se aos produtos de condensação complexos de componentes fenólicos do cacau, formados durante o processo de fermentação e secagem dos grãos (Souza, 2017). O tipo de cacau em pó adicionado às formulações dos pudins pode ter um impacto significativo na qualidade do produto final. Até determinado ponto, o aumento da sua percentagem induz uma melhoria da textura do produto, no entanto percentagens mais elevadas levam à diminuição da sua viscosidade e firmeza. Este caso particular observa-se à medida que a alcalinização da formulação aumenta (Saunders, 2016).

O amido presente nas formulações dos pudins desempenha um papel fundamental nas suas propriedades reológicas, corpo e na sensação que sente ao provar. Nas dispersões de amido, as interações entre os componentes do leite, o açúcar e os carragenanos são responsáveis pela organização da microestrutura do sistema e resulta num aumento da aparente viscosidade. A presença de cadeias de gordura, contribui para o aumento da viscosidade destas pastas à base de amido. A presença do açúcar nas formulações pode estar associada, entre outros motivos, ao efeito na redução da atividade de água (Alamprese & Mariotti, 2011; Ares et al., 2012).

O leite não adulterado ou suplementado é um produto natural, como um elevado valor nutricional, O leite de vaca constitui uma solução com 86%-90% de água, lactose (4,6%), proteína (2,5%-5%), minerais, vitaminas, entre outros componentes. O leite é uma emulsão de glóbulos de gordura (2-5%) dispersos numa fase contínua de soro. Após os processos de transformação e manipulação tecnológica do leite este pode sofrer profundas alterações na sua qualidade nutricional e nas suas propriedades organoléticas, alterações estas que resultam da hidrólise enzimática da gordura, oxidação de fosfolípidos, foto-oxidação, choque térmico e ação microbiana. Devido à complexa interação entre os diferentes componentes presentes num pudim, é provável que a substituição do leite por outro ingrediente cause mudanças drásticas no comportamento reológico do produto final (Lidon & Silvestre, 2007; Alamprese & Mariotti, 2011).

Os hidrocolóides são substâncias amplamente utilizadas em formulações alimentares de forma a melhorar a sua qualidade e a aumentar o seu tempo de prateleira. A maioria dos hidrocolóides corresponde a polissacarídeos solúveis em água. Os hidrocolóides são agrupados consoante a sua origem sendo que existem hidrocolóides extraídos de algas, como os alginatos, carragenanos e o agar-agar, os hidrocolóides extraídos de árvores exsudativas, os extraídos de diferentes grupos de plantas e, ainda, os hidrocolóides de origem animal como a já referida gelatina (neste caso, uma proteína). Os hidrocolóides possuem propriedades estabilizantes, espessantes e gelificantes, no entanto a sua atividade espessante ou gelificante varia consoante alguns fatores. Enquanto a ação espessante é altamente influenciada pela concentração, pH e temperatura, a ação gelificante envolve a interação com iões específicos (Li & Ni, 2016; Saunders, 2016; Benjakul et al., 2018; Kamal et al., 2018).

O carragenano, também denominado como carregenina ou carragena, é um aditivo alimentar (E407) natural, proveniente de algas marinhas vermelhas das famílias *Gigartinaceae*, *Solieriaceae*, *Hypneaceae* e *Furcellariceae*. Este aditivo é maioritariamente constituído por sais de potássio, sódio, cálcio e magnésio, dos ésteres sulfatados e polissacarídeos, que por hidrólise originam galactose e 3,6-galactose

anidra. O E407 apresenta-se na forma de pó grosseiro ou fino e é utilizado na indústria alimentar em produtos como sobremesas, gelados, compotas doces e geleias, leite ou produtos lácteos aromatizados (Lidon & Silvestre, 2007).

As gomas são extratos naturais, de origem vegetal, utilizadas pelas suas propriedades emulsionantes, espessantes, estabilizadoras e gelificantes, quando em solução. A goma de farinha de alfarroba (E410) tem funções de agente espessante sendo maioritariamente adicionada em compotas, doces e geleias, leite evaporado e aromatizado, sobremesas, gelados, queijos, entre outros alimentos. As gomas são constituídas por polissacarídeos não metabolizáveis pelas enzimas digestivas e têm uma ação idêntica a determinadas fibras alimentares. Desta forma, é possível afirmar que as gomas ajudam na regulação do trânsito intestinal. No entanto, quando consumidas sem moderação podem observar-se reações alérgicas, efeitos laxativos e inibição da absorção de alguns minerais, principalmente do cálcio (Lidon & Silvestre, 2007).

A combinação entre amidos hidrocolóides e hidrocolóides não derivados do amido, nomeadamente os gelificantes e os espessantes determinam as propriedades reológicas, forma e a finalidade do produto. A aparência característica cremosa dos pudins resulta da combinação harmoniosa entre estes agentes (Alamprese & Mariotti, 2011; Saunders, 2016).

1.3.3. Tempo de Prateleira e fatores que afetam a aceitação de um produto alimentar

O tempo de prateleira corresponde ao período de tempo de durabilidade mínima atribuído a um produto alimentar. Assim, o tempo de prateleira de um produto alimentar, refere-se ao período de tempo durante o qual o produto mantém o nível de qualidade requerido e a aceitação por parte do consumidor. Existem inúmeros fatores que podem influenciar a qualidade dos produtos alimentares ao longo do tempo. Dentro desses fatores incluem-se fatores intrínsecos ao alimento capazes de condicionar o crescimento microbiológico, como, por exemplo, o seu pH, atividade de água (a_w) ou disponibilidade em nutrientes. O tempo de prateleira pode também ser influenciado por fatores extrínsecos ao alimento, nomeadamente as condições de temperatura do armazenamento, o processo de embalagem, o tipo de embalagem utilizada, entre outros. Assim, o tempo de prateleira corresponderá ao período de tempo durante o qual um determinado alimento, armazenado em determinadas condições, mantém as suas características físico-químicas, microbiológicas e organolépticas, mantendo igualmente a

sua qualidade, segurança e aceitabilidade por parte dos consumidores. A determinação do tempo de prateleira implica assim a monitorização de determinadas características físico-químicas, microbiológicas e organoléticas de um alimento ao longo do seu tempo de armazenamento, de forma a verificar qual o período máximo em que este mantém todos os seus atributos de qualidade e segurança (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2011; Moschopoulou et al., 2019).

1.3.3.1. Parâmetros Físico-Químicos

A deterioração de um alimento pode levar a alterações da sua cor, pH, textura, propriedades reológicas, propriedades antioxidantes, entre outras. Assim, todos estes parâmetros podem ser avaliados para estipular o tempo de prateleira de um produto alimentar (Liu et al., 2019; Oliveira et al., 2019).

A cor corresponde a um importante atributo dos alimentos podendo ter um forte impacto na sua aceitação por parte dos consumidores. A cor deve ser avaliada de forma subjetiva, através da análise sensorial, mas também de forma quantitativa através de colorímetros. Estes instrumentos efetuam leituras de três parâmetros (L^* , a^* e b^*), onde o L^* indica a luminosidade e os eixos a^* e b^* representam coordenadas cromáticas. O parâmetro L^* encontra-se compreendido entre os valores de 0 e 100, onde 0 corresponde ao preto absoluto e o 100 corresponde ao branco absoluto. Relativamente ao parâmetro a^* , o sentido positivo (+a) representa uma tendência para cor vermelha, enquanto que o sentido negativo (-a) se assume como uma tendência para a cor verde. No que respeita ao parâmetro b^* , o sentido positivo (+b) representa uma tendência para a cor amarela, enquanto o sentido negativo (-b) se assume como uma tendência para a cor azul. Quanto maior o valor absoluto do parâmetro, maior a expressão da cor a ele associada. A mudança de cor que pode ocorrer com o passar do tempo de armazenamento dos produtos, num determinado intervalo de tempo, é expressa pelos valores de ΔL^* , Δa^* e Δb^* , onde ΔE representa a mudança total de cor calculada (Figiel et al., 2017).

Os corantes são aditivos que são adicionados aos alimentos de forma a aumentar a sua aceitabilidade sensorial e de forma a garantir a duração da cor mesmo após o processamento, influenciando, desta forma, a perceção final do consumidor quanto à qualidade do produto alimentar (Patras, 2019). Os corantes são produtos utilizados em pequenas quantidades como aditivos em inúmeros produtos alimentares. Estes corantes podem ser de origem natural, derivados de plantas e animais, ou de origem sintética. Em geral, os corantes são solúveis em água e a sua estabilidade pode ser afetada pela luz, calor, pH e agentes de oxidação-redução (Abbey et al., 2014).

O pH é outro dos parâmetros com maior capacidade de afetar a estabilidade dos alimentos. O crescimento microbiológico e as reações químicas ou enzimáticas que ocorrem num produto alimentar podem originar alterações do valor do pH. Por sua vez, as alterações de pH também podem influenciar o crescimento microbiano ou a ocorrência de reações químicas ou enzimáticas. As alterações de pH podem ainda ter impacto na textura e na cor dos alimentos. O método de medição e controlo de valores de pH mais amplamente utilizado, é o que recorre ao elétrodo de vidro, devido à sua resposta ser independente das interferências por reações de oxidação-redução e de alta reprodutibilidade (Oliveira et al., 2019).

1.3.3.2. Parâmetros Microbiológicos

A vigilância microbiológica dos alimentos prontos a comer corresponde a uma área de grande interesse em saúde pública, que tem por base garantir a salubridade dos alimentos e prevenir a incidência de doenças de origem alimentar. O crescimento microbiológico constitui um dos fatores mais preocupantes associados à degradação dos alimentos. As alterações provocadas por microrganismos podem estar na origem de perdas económicas significativas para o setor agrícola e para as indústrias alimentares.

As alterações microbiológicas podem ser influenciadas por fatores como temperatura de armazenamento, a presença de oxigénio, a composição do alimento, o pH, o tratamento térmico a que o alimento foi sujeito, a microbiota naturalmente presente nos alimentos, entre muitos outros. Estas alterações são provocadas pela presença de bactérias, leveduras e/ou bolores nos alimentos (Santos et al., 2005; Húngaro et al., 2014; Techer et al., 2019).

As bactérias são organismos unicelulares com uma estrutura muito simples o que favorece a sua replicação. A degradação dos alimentos pelas bactérias é mais frequente em alimentos que na sua constituição apresentam valores elevados de proteína, alta atividade de água (0,86 a 0,99) e valores de pH neutros. Exemplos destes alimentos são a carne, peixe, leite e produtos lácteos. Nos produtos lácteos, como o pudim, as bactérias mais conhecidas responsáveis pela sua degradação são as *Pseudomonas* spp, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Aerococcus*, *Lactococcus* e *Enterobacteriaceae* (Sancho-Madriz, 2003; Húngaro et al., 2014).

A contaminação resultante da presença de fungos (bolores e leveduras) nos alimentos continua a ser uma das maiores preocupações internacionais ao nível da segurança e higiene alimentar. Esta preocupação prende-se com a capacidade de diversos destes fungos serem capazes de produzir micotoxinas extremamente

perigosas para a saúde, sendo algumas delas mutagénicas e cancerígenas (Xu et al., 2020). As leveduras são microrganismos eucariotas e unicelulares, envolvidos na degradação de alimentos com elevado teor de açúcar ou sal e/ou baixo pH, características que lhes dão vantagem competitiva em relação às bactérias. A degradação provocada pelas leveduras afeta diretamente as características sensoriais dos alimentos, mais especificamente o sabor e a textura. Os géneros de leveduras mais envolvidos na degradação dos alimentos são a *Saccharomyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula* e *Pichia*. Os fungos filamentosos ou bolores são organismos pluricelulares, aeróbios, que se conseguem desenvolver em ambientes com valores variados de pH, temperatura e a_w e, em inúmeros alimentos tais como, grãos, carne, leite, fruta, vegetais, sementes e produtos com teores elevados de gordura. A degradação provocada por estes microrganismos nos alimentos manifesta-se através da descoloração, sabor estranho, perda de estrutura, perda de textura, formação de micélios visíveis e produção de compostos voláteis, em alimentos e bebidas. Os fungos filamentosos mais envolvidos na degradação dos alimentos pertencem aos géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Eurotium* e *Byssoschlamys* (Sancho-Madriz, 2003; Húngaro et al., 2014).

Os métodos tradicionais de análise microbiológica dos alimentos são aqueles que se baseiam na contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) após indução do crescimento dos microrganismos em meios de cultura específicos. Nos alimentos e bebidas, os principais microrganismos analisados são microrganismos indicadores de higiene e microrganismos patogénicos. Na análise dos microrganismos indicadores de higiene inclui-se a pesquisa de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, a análise de coliformes, bolores e leveduras a 25 °C, *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli*. Nos microrganismos patogénicos incluem-se as pesquisas de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus coagulase* positivos (Harrigan & McCance, 1966; Santos et al., 2005; Saraiva et al., 2019).

A análise microbiológica que engloba a amostragem, metodologia e distribuição dos microrganismos na matriz, por si só não garante a segurança de um produto final analisado. Posto isto, de forma a garantir a inocuidade dos alimentos prontos é necessário a implementação de medidas preventivas abrangidas pela aplicação do Sistema de Identificação de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP), constituindo as análises microbiológicas parte deste sistema (Harrigan & McCance 1966; Santos et al., 2005).

1.3.3.3. Parâmetros Organoléticos – Análise Sensorial

A análise sensorial pode ser definida como a disciplina científica utilizada para medir, analisar e interpretar reações a características dos alimentos e outras matérias, resultante da apreciação dos sentidos da visão, olfato, paladar, tato e audição (Stone et al., 2012). Atendendo que existe variação de análise de pessoa para pessoa, a análise sensorial acaba sempre por constituir uma análise subjetiva.

A avaliação sensorial constitui um fator chave para determinar o tempo de prateleira de muitos produtos alimentares. Em estudos de vida útil, é de elevada importância avaliar o comportamento dos atributos que conferem a qualidade ao produto alimentar, nomeadamente a aparência, cheiro, textura e sabor ao longo do seu tempo de prateleira, e desta forma, certificar que estes produtos mantêm níveis sensoriais aceitáveis ao longo do tempo (Hough et al., 2003; Hough 2010).

A análise sensorial é uma metodologia baseada na medição de propriedades sensoriais proferidas por um painel de participantes treinados ou por um painel de consumidores (Hough, 2010). Idealmente a análise sensorial é realizada por um painel treinado, utilizando métodos de avaliação reconhecidos (MFPI, 2016).

Os testes de análise sensorial têm por base diferentes métodos e variam de acordo com a avaliação que se pretende efetuar ao produto alimentar. Na Tabela 1.1 estão presentes os métodos e respetivas formas de avaliação, passíveis de efetuar numa análise sensorial.

Tabela 1.1 – Métodos utilizados e formas de avaliação sensorial (Hough, 2010)

Métodos	Formas de avaliação
Testes Discriminativos • Identificar as diferenças entre dois produtos	- Ensaio de comparação pareada e triangular - Método de ensaio de duplo padrão
Análise Descritiva • Quantificar com base em perceções de um grupo de indivíduos qualificados	- Método Qualitativo - Método Quantitativo
Testes Afetivos ou de aceitação • Quantificar o grau de aceitação e preferência	- Teste de comparação de pares - Escala Hedónica de nove pontos

A escala hedónica de 9 pontos desde que foi desenvolvida tem vindo a ser amplamente utilizada para medir a aceitação dos consumidores, de todo o tipo de produtos alimentares. Para além de se tratar de um teste intuitivo no ponto de vista do utilizador, garante a obtenção de resultados fiáveis e válidos (Curia, 2001).

1.3.4. Fatores Extrínsecos e a sua influência nos produtos prontos para consumo

Existem inúmeros fatores extrínsecos ao alimento que o podem danificar a curto ou a longo prazo, nomeadamente as condições e temperatura de armazenamento, o processo de embalamento ou o tipo de embalagem utilizada (Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2011; Moschopoulou et al., 2019). Estes fatores podem ter um impacto muito significativo no controlo do crescimento microbiano e das reações químicas ou enzimáticas que podem ocorrer nos alimentos. Todos os alimentos, ou a grande parte dos alimentos, prontos para consumo passam por um sistema de embalamento, o que se considera parte integrante do seu processo de produção industrial. É bem sabido que a utilização de embalagens nos alimentos tem como objetivos evitar contaminações externas, manter os alimentos frescos e com qualidade, e se possível, aumentar o seu tempo de prateleira. Desta forma, muitos autores descrevem quatro funções básicas do sistema de embalamento (Cruz et al., 2019; Siracusa & Lotti 2019):

- Proteção – Contra contaminações, alterações químicas ou biológicas, danificação e ruturas durante a distribuição e armazenamento;
- Comunicação – Contém toda a informação relacionada com o produto alimentar nomeadamente a informação nutricional, validade, os ingredientes, instruções e o modo de preparação/consumo;
- Conveniência – Informação relevante sobre o produto alimentar
- Contenção – Para um transporte mais fácil e seguro de manusear.

O sistema de embalamento recorre a mais de 30 plásticos diferentes, sendo as poliolefinas, os polivilinos e os poliésteres os mais utilizados. Os materiais plásticos são maleáveis, termo-selantes e imprimíveis uma vez que da sua constituição fazem parte grandes moléculas orgânicas, que contêm carbono, e que permitem a obtenção de uma gama variada de produtos. Dos diferentes tipos de plásticos destacam-se os politereftalato de etileno (PET), polipropileno (PP), polietileno de alta (HDPE) e baixa (LDPE) densidade, poliestireno (PS), policloreto de vinilideno (PVDC) e o policarbonato (PC). A maioria destes polímeros faz parte do grupo de termoplásticos, os quais podem ser reciclados. No entanto, quando são utilizadas múltiplas camadas de polímeros diferentes para produzir embalagens plásticas estas não podem ser recicladas (Cruz et al., 2019). O plástico mais utilizado para embalar e armazenar alimentos como o café, gelados, iogurtes, sobremesas e sumos de fruta é do tipo PS, tratando-se de um material transparente e que tende a ser bastante frágil. Devido à sua elevada

permeabilidade a gases e vapores trata-se do material mais adequado a produtos com tempos de vida útil curtos (Cruz et al., 2019).

A utilização de plásticos para a obtenção de embalagens de alimentos apresenta algumas desvantagens nomeadamente a possibilidade de migração de partículas químicas para os alimentos. Não obstante, devido à versatilidade do plástico, este material tem vindo a ser amplamente utilizado pelos diferentes tipos de indústrias alimentares. Só em 2015, quase 20 milhões de toneladas de plástico foram utilizadas apenas na Europa dando origem a aproximadamente 30 kg de desperdício de plástico por habitante anualmente. Deste modo, a forma tradicional do sistema de embalamento não só deve ter em conta as quatro funções básicas do sistema, como também a sua contribuição para a poluição do ambiente. Neste seguimento, as indústrias alimentares procuram soluções cada vez mais sustentáveis de forma a reduzir o seu impacto ambiental (Cruz, et al., 2019; Siracusa & Lotti, 2019).

1.3.5. Testes de Aceleração para determinação do tempo de prateleira

O tempo de prateleira é tradicionalmente determinado através da monitorização das alterações que se observam ao longo do tempo, nos alimentos embalados na sua embalagem original e sob condições ambientais controladas, isto é, que simulem as condições a que o produto alimentar é sujeito durante o seu armazenamento em loja. No entanto, estes testes de monitorização em tempo real, em determinados alimentos embalados, podem ser morosos. Nestas situações poderá ser vantajosa a realização de testes de aceleração do tempo de prateleira, através da exposição do alimento a condições ambientais que levam ao aceleração das reações de deterioração. Estes testes são vantajosos para os produtos que apresentam um longo tempo de prateleira, nomeadamente produtos estáveis à temperatura ambiente e refrigerados. Por outro lado, esta abordagem possibilita que as indústrias alimentares desenvolvam novos produtos e obtenham prazos de validade estimados, a fim de começarem a comercializar o novo produto o mais rapidamente possível. De forma a acelerar o tempo de vida dos produtos com um tempo de prateleira longo, estes são sujeitos a altas temperaturas, de forma a acelerar o desenvolvimento da deterioração e encurtar o tempo do estudo do tempo de vida útil (Mizrahi 2011; MFPI, 2016). De acordo com o artigo 3.º, n.º 2, do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, estabelece-se que os operadores das empresas do sector alimentar que são responsáveis pelo fabrico de produtos alimentares, terão de realizar estudos em

conformidade com o disposto, para investigar o cumprimento dos critérios durante toda a sua vida útil (Comissão Europeia, 2005).

Segundo o *Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products* elaborado pela *Food and Drug Administration* (FDA) produtos medicamentosos predestinados ao armazenamento em refrigeração, aproximadamente a 5 °C, deverão ser armazenados a uma temperatura de 25 ± 2 °C de forma a conseguir desenvolver um estudo do tempo de vida acelerado. Por outro lado, os produtos predestinados ao armazenamento à temperatura ambiente, aproximadamente entre os 25-30 °C, deverão ser armazenados a uma temperatura de 40 ± 2 °C. Desta forma, um ano do tempo de vida da amostra armazenada à temperatura de refrigeração corresponderá a seis meses armazenada à temperatura de 25 °C, no estudo de tempo de vida acelerado. No entanto, ainda que sejam observadas alterações significativas nas amostras armazenadas a 25 °C nos primeiros 3 a 6 meses do teste, o tempo de prateleira inicialmente proposto deverá ser baseado nas amostras armazenadas à temperatura de refrigeração (FDA, 2003).

2. Materiais e Métodos

O presente trabalho experimental teve por base a análise de amostras de sobremesas prontas para consumo. Foram avaliadas duas gamas de produtos prontos nomeadamente, a gama com açúcar e a gama zero. Da gama com açúcar apenas foram preparadas e analisadas amostras de gelatinas e da gama zero foram analisadas amostras de gelatinas e de pudins. Ao longo do tempo de recolha de dados houve necessidade de se prepararem novas amostras de acordo com diferentes modos de preparação de forma a colmatar as deficiências encontradas nos métodos previamente testados. Assim sendo, a preparação dos três métodos foi sequencial. Na Figura 2.1 é possível observar a esquematização das diferentes gamas e produtos analisados, assim como os respetivos métodos de preparação estudados no presente trabalho.

As temperaturas de armazenamento predefinidas para as amostras do presente estudo foram de: 4 °C, 13 °C e 25 °C. A temperatura de armazenamento de 4 °C corresponde à temperatura real de armazenamento das amostras. A temperatura de armazenamento de 13 °C pretende simular uma quebra na cadeia do frio, aquando o transporte das amostras. Por último, o armazenamento das amostras à temperatura de 25 °C em estufa, teve como objetivo acelerar o tempo de vida das mesmas e desta forma, prever antecipadamente a sua degradação. Todas as amostras foram preparadas nas instalações da empresa e embaladas em embalagens de polipropileno (PP) com capacidade máxima de 180 mL (Figura 2.2).

Ao longo do tempo de armazenamento as amostras foram sujeitas a análise, de periodicidade semanal, físico-química (cor e pH), análise sensorial (avaliação do aspeto, cor, consistência/textura, sabor, doçura e acidez), análise microbiológica (microrganismos mesófilos totais a 30 °C, bolores e leveduras, microrganismos psicrótróficos e *Enterobacteriaceae*) e ainda à pesquisa de alergénios (glúten) de acordo com as técnicas seguidamente descritas.

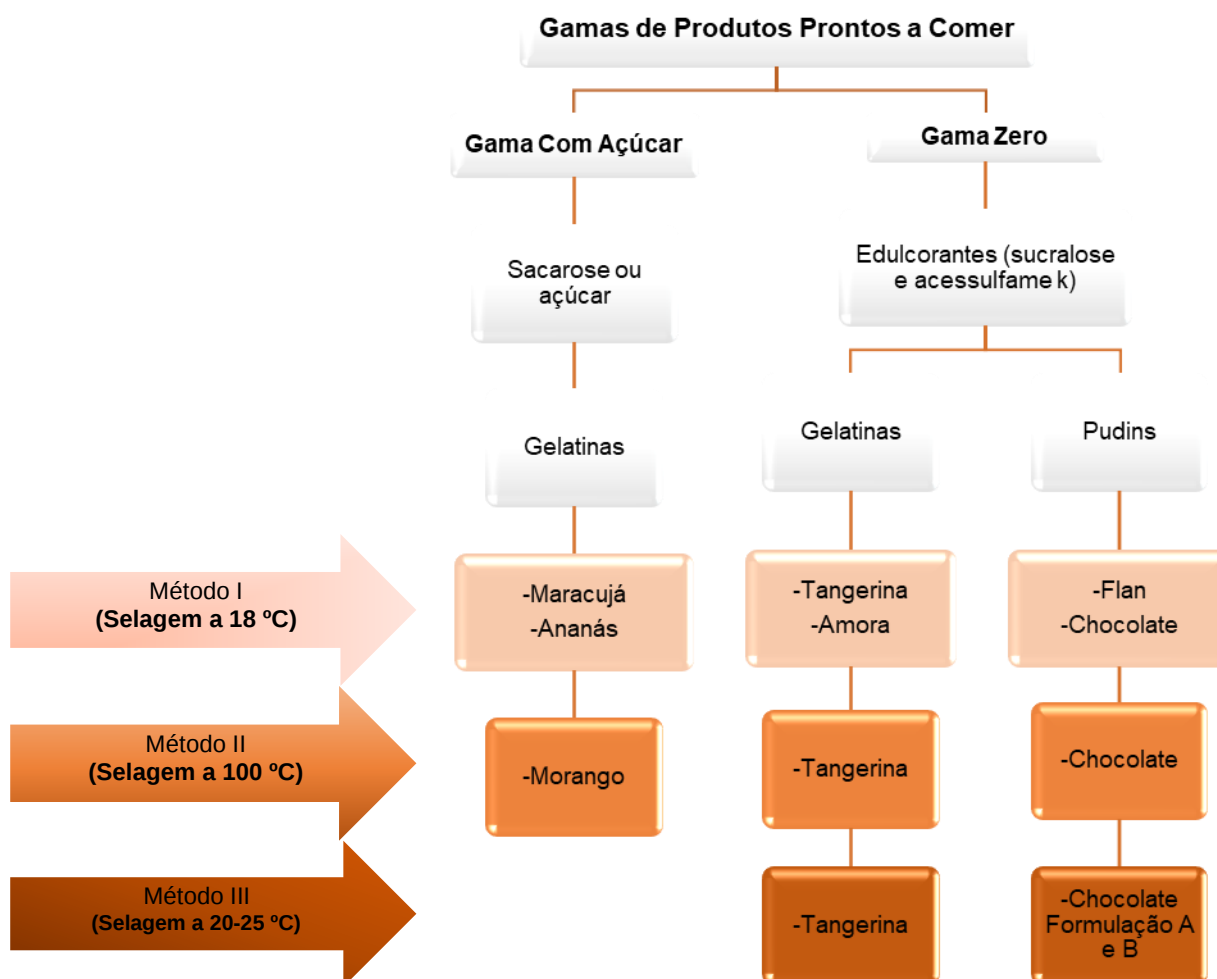


Figura 2.1 – Esquematização das gamas de produtos analisados e respectivas condições de selagem das embalagens



Figura 2.2 – Embalagem do tipo PP utilizada para o embalamento das amostras

2.1. Gelatinas Prontas

Conforme já referido, foram utilizadas neste estudo gelatinas da gama zero e da gama com açúcar. Todas as gelatinas testadas foram preparadas a partir de formulações em pó, previamente desenvolvidas. Foram testados três diferentes métodos de preparação/condições de embalagem, designados por Método I, II e III. As amostras preparadas de acordo com cada um destes métodos foram seladas a diferentes temperaturas e para o efeito utilizou-se o termómetro digital da marca *Lacor* (Referência 62498) com uma amplitude de medição entre os 0 e os 300 °C. Posteriormente as amostras foram colocadas em diferentes temperaturas e analisadas ao longo do tempo de armazenamento.

2.1.1. Gelatinas preparadas de acordo com o Método I

Numa primeira fase do trabalho experimental foram preparados quatro tipos de amostras de gelatina, duas da Gama Zero (gelatinas de tangerina e amora) e duas da Gama com Açúcar (gelatinas de maracujá e ananás). O método de preparação destas amostras (Método I) iniciou-se com a adição de 1 L de água à formulação em pó de cada uma das respetivas gelatinas. Seguidamente, as misturas foram aquecidas até entrarem em ebulição e, nessa altura, adicionou-se novamente 1 L de água fria. As misturas foram distribuídas pelas embalagens, em volumes de 160 mL por embalagem, tendo estas sido deixadas abertas, em local refrigerado, até atingirem uma temperatura aproximadamente igual a 18 °C. Neste ponto, selaram-se as embalagens com um revestimento de plástico e colocaram-se amostras de cada uma das gelatinas a diferentes temperaturas (4 °C e 25 °C) para serem posteriormente analisadas ao longo do tempo de armazenamento. A Tabela 2.1 descreve as amostras estudadas e as condições de temperatura de selagem e de conservação utilizadas no Método I.

Tabela 2.1 – Gelatinas preparadas de acordo com o Método I e respetivas temperaturas de selagem e armazenamento

Gama Zero	Temperatura de Selagem	Temperatura de Armazenamento	
Gelatina de Tangerina	≈18 °C	4 °C	25 °C
Gelatina de Amora	≈18 °C	4 °C	25 °C
Gama com Açúcar	Temperatura de Selagem	Temperatura de Armazenamento	
Gelatina de Maracujá	≈18 °C	4 °C	25 °C
Gelatina de Ananás	≈18 °C	4 °C	25 °C

2.1.2. Gelatinas preparadas de acordo com o Método II

Numa segunda fase do trabalho experimental foram preparados dois tipos de amostras de gelatina, uma da Gama Zero (gelatina de tangerina) e uma da Gama com Açúcar (gelatina de morango). Estas gelatinas foram preparadas de acordo com o Método II. Este método de preparação iniciou-se com a adição de 2 L de água fria às formulações de gelatina em pó. De seguida, as misturas foram aquecidas até entrarem em ebulição. Uma vez atingido este ponto, cronometraram-se 5 minutos de fervura. Terminados estes 5 minutos, as misturas foram imediatamente distribuídas pelas embalagens até à sua capacidade máxima (180 mL), de modo a minimizar/eliminar a presença de ar dentro das embalagens, tendo estas sido de imediato seladas com uma película de plástico. Assim, no método II a selagem foi efetuada a uma temperatura aproximada dos 100 °C. Após um tempo à temperatura ambiente e voltadas para baixo, as gelatinas foram armazenadas às temperaturas de 4 °C, 13 °C e 25 °C. A Tabela 2.2 descreve as amostras estudadas e as condições de temperatura de selagem e de conservação utilizadas no Método II.

Tabela 2.2 – Gelatinas preparadas de acordo com o Método II e respetivas temperaturas de selagem e armazenamento

Gama Zero	Temperatura de Selagem	Temperatura de Armazenamento		
Gelatina de Tangerina	≈100 °C	4 °C	13 °C	25 °C
Gama com Açúcar	Temperatura de Selagem	Temperatura de Armazenamento		
Gelatina de Morango	≈100 °C	4 °C	13 °C	25 °C

2.1.3. Gelatinas preparadas de acordo com o Método III

O Método III foi testado numa amostra de gelatina da Gama Zero (gelatina de tangerina). O Método III consistiu em adicionar 1/3 da água fria à formulação de gelatina (≈ 670 mL) tendo-se levado ao lume até ferver. Posteriormente, adicionou-se a restante quantidade de água fria (≈ 1 330 mL), até perfazer os 2 L. De forma a garantir o arrefecimento antes da selagem da embalagem, deixou-se a gelatina preparada a repousar na panela até atingir uma temperatura de aproximadamente 25-30 °C. Uma vez atingida a temperatura desejada, distribuiu-se a gelatina pelas embalagens, em volumes de 100 mL por embalagem (volume pretendido comercialmente), tendo estas

sido imediatamente seladas com uma película de plástico. A gelatina preparada de acordo com o Método III foi armazenada às temperaturas de 4 °C, 13 °C e 25 °C (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Gelatinas preparadas de acordo com o Método III e respetivas temperaturas de selagem e armazenamento

Gama Zero	Temperatura de Selagem	Temperatura de Armazenamento		
Gelatina de Tangerina	≈ 25 °C - 30 °C	4 °C	13 °C	25 °C

2.2. Pudins Prontos

Neste estudo foram avaliados pudins da gama zero, nomeadamente pudim flan e pudim de chocolate, preparados a partir de formulações em pó, previamente desenvolvidas. No caso do pudim de chocolate foram ainda testadas alterações à formulação original, designadas por formulação A e B, que se diferenciaram pela percentagem de leite em pó presente na formulação. Tal como no caso das gelatinas, também se testaram diferentes métodos de preparação/condições de embalagem, designados por Método I, II e III. As amostras preparadas de acordo com cada um destes métodos foram seladas a diferentes temperaturas e para o efeito utilizou-se o termómetro digital da marca *Lacor* (Referência 62498) com uma amplitude de medição entre os 0 e os 300 °C. Posteriormente as amostras foram colocadas em diferentes temperaturas e analisadas ao longo do tempo de armazenamento.

2.2.1. Pudins preparados de acordo com o Método I

O primeiro modo de preparação dos pudins flan e de chocolate (formulação original), da gama zero, consistiu na adição de uma pequena quantidade de água fria à formulação em pó. De seguida mexeu-se lentamente até deixarem de existir grumos. Nessa altura, adicionou-se água até perfazer o volume de 1 L e aqueceu-se a mistura até esta entrar em ebulição, mantendo sempre a agitação. Posteriormente, encheram-se as embalagens com 160 mL de cada pudim, sendo que a capacidade máxima das taças era igual a 180 mL. Por fim, deixaram-se as embalagens abertas até atingirem uma temperatura aproximadamente igual a 18 °C. Selaram-se as embalagens com um

revestimento de plástico e mantiveram-se armazenadas a uma temperatura de 4 °C e 25 °C (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 – Pudins preparados de acordo com o Método I e respectivas temperaturas de selagem e armazenamento

Gama Zero	Temperatura de Selagem	Temperatura de Armazenamento	
Pudim Flan	≈18 °C	4 °C	25 °C
Pudim de Chocolate (formulação original)	≈18 °C	4 °C	25 °C

2.2.2. Pudins preparados de acordo com o Método II

Para o segundo modo de preparação apenas foi preparada a amostra de pudim de chocolate da gama zero (formulação original). Neste novo modo de preparação, uma vez atingido o ponto de fervura, cronometraram-se 2 minutos. Posteriormente, encheram-se as embalagens até à sua capacidade máxima, 180 mL, e selaram-se de imediato, com uma película de plástico, a uma temperatura aproximada dos 100 °C. Após um tempo à temperatura ambiente, com as embalagens voltadas para baixo, as amostras de pudim de chocolate foram armazenadas às temperaturas de 4 °C e 25 °C (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 – Pudim preparado de acordo com o Método II e respectivas temperaturas de selagem e armazenamento

Gama Zero	Temperatura de Selagem	Temperatura de Armazenamento	
Pudim de Chocolate (formulação original)	≈100 °C	4 °C	25 °C

2.2.3. Pudins preparados de acordo com o Método III

Para o Método III prepararam-se amostras de pudim de chocolate tendo-se, no entanto, efetuado alterações à formulação original. Assim, foram preparadas duas novas formulações, designadas por A e B, a partir da formulação original. Na formulação A, a percentagem de leite meio-gordo em pó foi aumentada de 7,0% para 9,8%, em

relação à formulação original. No caso da formulação B, percentagem de leite meio-gordo em pó foi aumentada de 7,0% para 14,0%, em relação à formulação original.

2.2.3.1. Pudim de Chocolate Formulação A

Para preparar o pudim de chocolate com a formulação A (pudim de chocolate A) adicionaram-se 425 mL de água morna à formulação em pó. De seguida, a mistura foi aquecida sob agitação lenta até atingir os 85°-95 °C. Após atingir esta temperatura foram contabilizados 2 minutos. Por fim, distribuiu-se o preparado pelas embalagens (100 mL/embalagem), e procedeu-se à respetiva selagem com película de plástico, quando o pudim atingiu uma temperatura de 20 a 25 °C (Tabela 2.6). Após selagem, as amostras foram armazenadas a uma temperatura de 4 °C.

Tabela 2.6 – Pudim de chocolate com a Formulação A preparado de acordo com o Método III e respetivas temperaturas de selagem e armazenamento

Gama Zero	Temperatura de Selagem	Temperatura de armazenamento
Pudim de Chocolate A	20 °C - 25 °C	4 °C

2.2.3.2. Pudim de Chocolate Formulação B

Para preparar o pudim de chocolate com a formulação B (pudim de chocolate B) adicionaram-se 405,6 mL de água morna à formulação em pó. De seguida, a mistura foi aquecida sob agitação lenta até atingir os 85°- 95 °C. Após atingir esta temperatura foram contabilizados 2 minutos. Por fim, distribuiu-se o preparado pelas embalagens (100 mL/embalagem), e procedeu-se à respetiva selagem com película de plástico, quando a mistura apresentava uma temperatura entre os 20 °C e os 25 °C. As embalagens foram armazenadas a uma temperatura de 4 °C, para posteriores análises (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 – Pudim de chocolate com a Formulação B preparado de acordo com o Método III e respetivas temperaturas de selagem e armazenamento

Gama Zero	Temperatura de Selagem	Temperatura de armazenamento
Pudim de Chocolate B	20 °C - 25 °C	4 °C

2.3. Parâmetros de Segurança e Qualidade

2.3.1. Determinação do pH

Para a determinação do pH utilizou-se um medidor de pH 50XS com um eletrodo de pH de líquidos, da marca *Labprocess* e modelo G PH 50+, previamente calibrado com duas soluções padrão de pH 4,00 e pH 7,00. Para fazer a medição o eletrodo foi inserido no centro das amostras e procedeu-se à leitura do respetivo valor. A medição do pH foi realizada em triplicado para todas as amostras preparadas de acordo com o Método II.

2.3.2. Determinação da Cor

Para a determinação da cor das amostras utilizou-se o colorímetro, com uma área de medição de 50 mm, da marca *Konica Minolta* e modelo CR-410, previamente calibrado com três disparos sob uma superfície lisa e branca. O colorímetro CR-410 é ideal para inspeções de cores de alimentos, particularmente com textura e superfícies em condições irregulares. As amostras foram perfuradas no centro e procedeu-se à medição e registo do valor.

As medições foram realizadas em triplicado para todas as amostras preparadas de acordo com o Método II. As coordenadas da cor L^* , a^* e b^* foram obtidas e o ΔE foi calculado de acordo com a Equação 1 (Putnik et al., 2017).

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

(Equação 1 – Cálculo do ΔE)

Onde ΔL^* , Δa^* e Δb^* representam a variação de cada uma das coordenadas em relação aos valores obtidos para o tempo zero (T_0).

2.3.3. Pesquisa de Glúten

A quantificação do glúten foi efetuada em todas as formulações em pó utilizadas para a preparação de amostras. Segundo o Regulamento de Execução (EU) N°828/2014 a menção “Isento de glúten” só pode ser utilizada em géneros alimentícios que contenham menos do que 20 mg/kg de glúten na sua constituição (Parlamento Europeu; Conselho da União Europeia 2014).

Para a determinação da presença de glúten nas amostras foi utilizado o teste ELISA recorrendo ao kit *RIDASCREEN® Gliandin*, marca (*r-Biopharm*) e soluções de extração acessórias (Cocktail patenteado, *r-Biopharm*). O teste Elisa é um imunoensaio enzimático que tem como objetivo determinar quantitativamente as prolaminas presentes no glúten, mais especificamente a gliadina. O teste tem por base o método imunológico do tipo *sandwich*. Neste formato, os alérgenos ligam-se ao anticorpo de captura, que se encontra imobilizado nos poços das microplacas, formando um complexo anticorpo-antigénio. Este complexo é posteriormente detetado por um anticorpo secundário, ligado a uma enzima que converte um substrato num produto colorido e passível de ser quantificado espectralmente (Figura 2.3). Desta forma, o desenvolvimento de coloração indica a presença de glúten, sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional à quantidade de glúten presente na amostra.

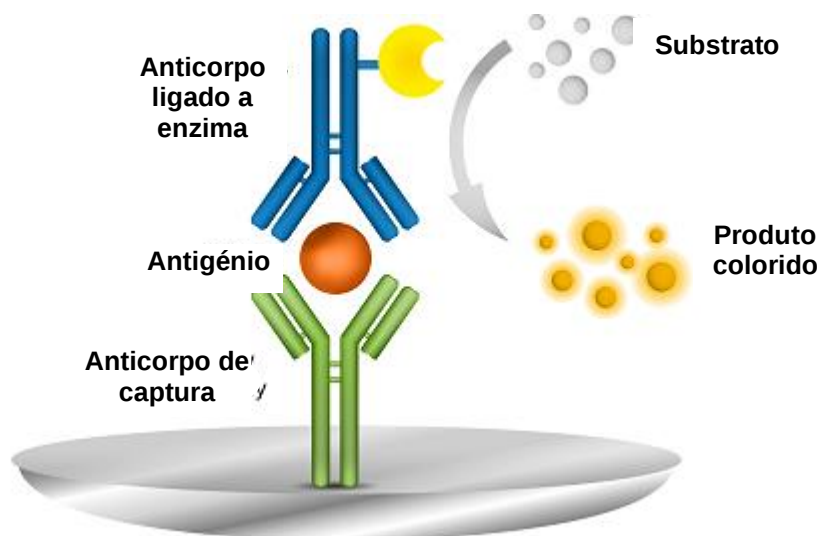


Figura 2.3 - Esquema do funcionamento dos ensaios ELISA em formato sanduíche (adaptado de Molecular Devices, 2020).

Todo o ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Sumariamente, para a extração pesaram-se 0,25 g de cada amostra e adicionaram-se 2,5 mL de solução de extração. As diversas misturas foram incubadas em banho de água a 50 °C, durante 40 minutos (Banho de água digital, *Nahita*). Seguidamente, adicionaram-se 7,5 mL de etanol 80% a cada tubo e colocaram-se os tubos no *rotator* (RSLab 9 AR) durante 1 hora, à velocidade máxima. Por último, as amostras foram centrifugadas a 2 500 rpm, durante 10 minutos (centrífuga *Nahita* 2640/8), tendo-se recolhido o sobrenadante.

Para a etapa de quantificação transferiram-se de 100 µL de seis padrões de gliadina, com concentrações entre 0,0 e 80,0 ng/mL, e 100 µL de cada amostra diluída em tampão de extração para os respectivos poços da microplaca. Para que ocorresse a ligação antigénio-anticorpo as placas permaneceram durante 30 minutos à temperatura ambiente. No final deste tempo, descartou-se o líquido e lavaram-se os poços, 3 vezes, com 250 µL de solução de lavagem. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de solução conjugado, preparada na hora, a cada poço, e após um período de 30 minutos à temperatura ambiente, descartou-se mais uma vez o líquido. Os poços foram novamente lavados 3 vezes com 250 µL de solução de lavagem. Finalmente, adicionaram-se 50 µL de solução de substrato e 50 µL de agente cromogénio (a enzima vai catalizar uma reação de oxidação redução entre o substrato e o agente cromogénico) a cada poço, e deixou-se durante mais 30 minutos no escuro. Por fim adicionaram-se 100 µL de solução de terminação (solução STOP) e fez-se a leitura da absorvância a 450 nm (Leitor de microplacas de absorvância/ELISA StatFax 4700).

Todos os dados recolhidos foram tratados através do *software RIDA SOFT Win*.

2.3.4. Análise Microbiológica

Os ensaios microbiológicos foram realizados nas instalações da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Os parâmetros microbiológicos avaliados, bem como os respetivos métodos realizados encontram-se na Tabela 2.8.

Tabela 2.8 - Parâmetros microbiológicos e respetivas referências do método

Parâmetros	Referência do Método
Contagem de Microrganismos Aeróbios Totais a 30 °C	ISO 4833-1:2013
Contagem de Bolores e Leveduras	ISO 21527-1:2008
Contagem de Microrganismos Psicrotróficos	ISO 17410-1:2001
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528-2:2017

Todo o procedimento de análise microbiológica foi efetuado em condições de esterilidade numa câmara de fluxo laminar horizontal (Steril-VBH, N° série 11649). Para preparação da suspensão inicial, pesaram-se 10 g de cada amostra para sacos de *Stomacher* estéreis de capacidade de 400 mL, com o auxílio de espátulas igualmente estéreis, e homogeneizou-se, em 90 mL de triptona-sal (BIOKAR Diagnostic, BK014), por agitação contínua, durante 30 segundos, no agitador *Stomacher*, modelo *Star Blender* LB 400 e marca VWR.

Em seguida, prepararam-se diluições decimais das diversas suspensões iniciais, por transferência de 1 mL da suspensão mais concentrada, para um tubo com 9 mL de

triptona-sal. A triptona-sal (0,1% triptona, 0,85% NaCl) é usada como diluente na preparação de suspensões iniciais e diluições de alimentos para análise microbiológica. A triptona assegura a recuperação de microrganismos que possam ter sido submetidos a condições de *stress*, e o NaCl tem como objetivo manter a isotonia entre o citoplasma celular e o diluente, evitando assim a osmose entre os dois meios (Neogen Corporation, 2010; Guerra, 2016).

Contagem de Microrganismos Aeróbios Totais a 30 °C

A contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C foi realizada em meio *Plate Count Agar* (PCA) de acordo com a ISO 4833-1:2013. O meio PCA contém triptona (0,5%), glucose (0,1%), extrato de levedura (0,25%) e agar (1,2%) (BIOKAR, 2020a). Os nutrientes fornecidos pela triptona, em conjunto com as vitaminas presentes no extrato de levedura e com a presença de glucose como fonte de energia, promovem o crescimento da maioria das bactérias (BIOKAR, 2020a).

O meio PCA foi preparado por dissolução de 2,05 g de meio PCA desidratado (BIOKAR BK144HA) em 100 mL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore), seguida de esterilização em autoclave (*Darlab*, k-400) a 121 °C, durante 15 minutos.

A inoculação das amostras foi efetuada por incorporação, transferindo-se 1 mL da suspensão inicial e de cada uma das diluições decimais (até à diluição 10^{-3} ou até à 10^{-6} no caso da análise do pudim de chocolate preparado pelo Método II) para placas de Petri estéreis às quais se adicionaram, de seguida, 20 mL de meio PCA à temperatura de 40 °C, aproximadamente. As placas foram agitadas para garantir a distribuição uniforme do inóculo e, após solidificação, foram incubadas em estufa (Memmert) à temperatura de 30 ± 2 °C durante 72 ± 3 horas. No final do período de incubação procedeu-se à contagem de todas as colónias formadas nas placas, que continham até um máximo de 300 Unidades Formadoras de Colónias (UFC).

Contagem de Microrganismos Psicrotróficos

A contagem de microrganismos psicrotróficos foi realizada em meio PCA de acordo com a ISO 17410-1:2001. O procedimento realizado foi em tudo idêntico ao anteriormente descrito para a contagem dos microrganismos aeróbios totais a 30 °C, com duas grandes diferenças, que se prendem com o modo de inoculação e com as condições de incubação. Uma vez que os microrganismos psicrotróficos são sensíveis ao calor a inoculação foi realizada por espalhamento à superfície. Assim, após esterilização, o meio PCA foi distribuído em volumes de aproximadamente 20 mL por

placas de Petri estéreis. Seguidamente, procedeu-se à inoculação por espalhamento à superfície de 1 mL da suspensão inicial, distribuído por três placas diferentes, e 100 µL das respetivas diluições decimais (até à diluição 10^{-3}) em cada placa de Petri. As placas foram incubadas a 6,5 °C durante 10 dias.

Contagem de Bolores e Leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi realizada em meio *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar* (DRBC), de acordo com a ISO 21527-1:2008. O meio DRBC é constituído por peptona (0,5%), glucose (1%), fosfato de monopotássio (0,1%), sulfato de magnésio tetrahidratado (0,05%), *dicloran* (2 mg/L), *rose-bengal* (25 mg/L), cloranfenicol (50 mg/L), cloridrato de clortetraciclina (50 mg/L), sulfato de zinco heptahidratado (10 mg/L), sulfato de cobre pentahidratado (5 mg/L), tergitol (1 mL/L) e agar (1,24%) (BIOKAR, 2020b).

A peptona e a glucose asseguram o crescimento dos bolores e leveduras. O *dicloran* e o *rose bengal* reduzem o crescimento dos fungos, impedido o crescimento excessivo das colónias nas placas. O *rose bengal* é facilmente assimilado por leveduras, fazendo com que estas corem de rosa, o que facilita a sua contagem. A presença de cloranfenicol, um antibiótico resistente ao calor, e de cloridrato de clortetraciclina reforça a seletividade do meio contra a maioria dos contaminantes bacterianos. O tergitol limita a proliferação por *Mucoraceae*. O zinco e o cobre na forma de sulfatos melhoram a produção de pigmentos dos fungos filamentosos (BIOKAR, 2020b).

O meio DRBC foi preparado por dissolução de 30,0 g de meio desidratado (BIOKAR, BK198HA) em 1 000 mL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore), seguida de esterilização em autoclave (*Darlab*, k-400) a 121 °C, durante 15 minutos. Após esterilização o meio foi distribuído em volumes de 20,0 mL por placas de Petri esterilizadas. Para a contagem dos bolores e leveduras foi efetuada a inoculação por espalhamento à superfície, tendo-se adicionado 1 mL da suspensão inicial, distribuído por três placas diferentes, e 100 µL das respetivas diluições decimais (até à 10^{-3}) em cada placa de Petri. As placas foram incubadas em estufa (Memmert) à temperatura de 25 ± 2 °C durante cinco dias, sem serem invertidas de modo a evitar a disseminação dos esporos. No final do período de incubação procedeu-se à contagem de todas as colónias formadas nas placas, que continham até um máximo de 150 UFC.

Contagem de Enterobacteriaceae

A contagem de *Enterobacteriaceae* foi realizada em meio *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBG), de acordo com a ISO 21528-2:2017. O meio VRBG é constituído por peptona (0,7%), extrato de levedura (0,3%), glucose (1,0%), sais biliares (0,15%), cloreto de sódio (0,5%), *neutral red* (30,0 mg/L), cristal violeta (2,0 mg/L) e agar (1,3%) (Biokar, 2020c). A presença simultânea de sais biliares e de cristal violeta inibe o crescimento das bactérias gram-positivas. A produção de ácido a partir da glucose é demonstrada pela cor vermelha do indicador de pH, *neutral red* (Biokar, 2020c).

O meio VRBG foi preparado por dissolução de 39,5 g de meio desidratado (BIOKAR, BK011HA) em 1 000 mL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore). O meio foi aquecido, em placa elétrica, sob agitação até entrar em ebulição, tendo, seguidamente, sido arrefecido até 45 °C e utilizado nas quatro horas seguintes.

Para a contagem de *Enterobacteriaceae* foi igualmente efetuada a inoculação por incorporação. Primeiramente, adicionou-se 1 mL da suspensão inicial, ou de cada uma das diluições decimais (até à diluição 10^{-3}), em cada placa de Petri, tendo-se adicionado, de seguida, 10 mL de meio VRBG a uma temperatura de 45 °C. As placas foram agitadas para uniformizar e deixaram-se solidificar. Por último, adicionaram-se mais 15 mL de meio VRBG (*overlay*) e deixou-se solidificar. Com a adição desta segunda camada de meio, pretende limitar-se o crescimento excessivo das colónias e atingir-se condições semi-anaeróbias. As placas foram incubadas a 37 ± 2 °C, durante 24 ± 2 horas.

No final da incubação, as placas foram observadas para identificação e contagem das colónias características (colónias pequenas de cor rosa, vermelha ou púrpura). No caso de se encontrarem presentes colónias características, foi necessário proceder à sua confirmação através dos testes da oxidase e da fermentação da glucose. Para tal, repicaram-se as colónias para placas de Petri contendo meio rico não seletivo Triptona Soja Agar (BIOKAR, BK047) e incubou-se a 37 ± 2 °C, durante 24 ± 2 horas. Seguidamente, realizou-se o teste da oxidase, transferindo-se, com o auxílio de uma ansa, as colónias a confirmar para tiras para teste Oxidase (Pyo Test™). O resultado positivo é visualizado pelo desenvolvimento de uma coloração azul após 10 segundos.

As colónias que apresentaram resultado negativo, foram transferidas para meio Glucose OF agar. Este meio é constituído por um digerido enzimático de caseína (2 g/L), glucose (10 g/L), cloreto de sódio (5 g/L), hidrogenofosfato dipotássico (0,3 g/L), azul de bromotimol (0,08 g/L) e agar (4 g/L). O digerido de caseína proporciona azoto, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais para o crescimento das colónias. O cloreto de sódio garante o equilíbrio osmótico, o hidrogenofosfato dipotássico funciona

como tampão, a glucose como fonte de energia, o azul de bromotimol como indicador de pH e o, por último, o agar atua como agente solidificante (Condalab, 2020).

O meio Glucose OF agar foi preparado por dissolução de 21,38 g de meio desidratado (Condalab, Cat.2150) em 1 000 mL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore). O meio foi aquecido, em placa elétrica, sob agitação até dissolução completa tendo, de seguida, sido distribuído por tubos de ensaio em volumes de 10 mL por tubo. Os tubos foram então esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos e arrefecidos em posição vertical. Antes de usar, os tubos foram aquecidos em banho de água a ferver, durante 15 minutos para eliminar o oxigénio e arrefecidos até aos 37 °C. Por último os tubos foram inoculados, cobriu-se a superfície do meio com 1 cm de parafina líquida estéril, para garantir condições anaeróbias, e incubou-se a 37 ± 2 °C, durante 24 ± 2 horas. A fermentação da glucose pode ser visualizada pelo desenvolvimento de uma coloração amarela. A confirmação foi efetuada se as bactérias apresentavam simultaneamente reação negativa ao teste da oxidase e reação positiva ao teste da fermentação da glucose.

2.4. Análise Sensorial

De forma a verificar a evolução das amostras ao longo do seu tempo de vida útil, efetuaram-se múltiplas provas de análise sensorial. As provas foram efetuadas semanalmente para todas as amostras mantidas à temperatura de 4 °C.

As provas realizaram-se numa sala branca e livre de odores que pudessem interferir com as avaliações do painel. O painel consistiu num total de 5 provadores treinados pertencentes ao painel interno da empresa. Em cada prova foi solicitado aos provadores o preenchimento de um inquérito sobre as diferentes amostras (Anexo I). O inquérito teve como objetivo classificar diversos atributos como o aspeto, cor, consistência, sabor, doçura, acidez e classificação geral para as amostras de gelatina, e o aspeto, cor, textura, sabor, doçura e classificação geral para as amostras de pudim, de modo a perceber como estes atributos estavam a variar ao longo do tempo de armazenamento dos produtos. A classificação foi realizada por meio de uma escala hedónica de 5 pontos, onde 1 correspondia à classificação de “Não gostei nada”, 2 à classificação de “Gostei pouco”, 3 à classificação de “Indiferente”, 4 à classificação de “Gostei” e, por fim, 5 correspondia à classificação de “Gostei muito”.

2.5. Análise Estatística de Dados

De forma a determinar se existiam diferenças significativas entre os vários parâmetros analisados, realizou-se a análise paramétrica ANOVA, seguida de “Teste Tukey” ou “Teste Unequal N”, dependendo do número de replicados em análise. Antes da realização da ANOVA foram testados os pressupostos da análise, isto é, a normalidade dos resíduos e a homogeneidade de variância. O nível de significância para a análise estatística efetuada foi de 0,05, tendo sido utilizado o *software* STATISTICA 7.0[®] no tratamento dos dados.

3. Resultados e Discussão

Conforme já referido anteriormente, neste trabalho pretendeu-se fazer a avaliação da estabilidade química, microbiológica e sensorial de sobremesas prontas a consumir, durante o seu período de armazenamento. Os resultados obtidos foram permitindo verificar a existência de diversos problemas e, por isso, houve necessidade de se irem fazendo alterações, quer no método de preparação quer na forma de enchimento e selagem das embalagens. Assim, surgiram os três métodos (Método I, II e III) anteriormente descritos de preparação de sobremesas, cujos resultados dos ensaios de estabilidade se apresentam de seguida.

3.1. Análises de estabilidade das sobremesas preparadas de acordo com o Método I

No Método I o objetivo passou por tentar embalar os produtos a uma temperatura baixa, de forma a evitar a presença de condensação nas embalagens. Por outro lado, de forma a minimizar a probabilidade de recontaminação do produto durante o arrefecimento, tentou minimizar-se igualmente o tempo desta operação. Assim, os produtos foram aquecidos até à ebulição apenas com metade da quantidade da água necessária para a sua preparação, sendo a outra metade adicionada imediatamente a seguir. Esta adição da água fria teve como objetivo acelerar o arrefecimento do produto. Também como forma de acelerar o arrefecimento, procedeu-se o mais rápido possível à distribuição dos produtos pelas embalagens. Assim, os produtos foram aquecidos até à temperatura de ebulição, arrefecidos através da adição de água fria, distribuídos em volumes de 160 mL por embalagem, e deixados a arrefecer até atingirem uma temperatura de aproximadamente 18 °C, sendo então a embalagem selada.

3.1.1. Gelatinas Prontas

O Método I foi utilizado para preparar quatro gelatinas diferentes. Uma vez que a presença de açúcar pode ter impacto na conservação das amostras, escolheram-se produtos da gama zero (sem açúcar adicionado) e da gama açucarada. Com efeito, a adição de açúcar em alimentos como frutas, vegetais e carnes constitui uma das formas mais antigas de conservação de alimentos, uma vez que a adição deste aos alimentos favorece ambientes de elevada pressão osmótica e, desta forma, impede a proliferação bacteriana ao induzir um envolvente com uma baixa atividade da água (Goswami &

Shah, 2013). Foram também escolhidos diferentes sabores para ser possível avaliar o comportamento dos diversos aromas e corantes ao longo do tempo de armazenamento. Assim, prepararam-se pelo Método I quatro gelatinas diferentes: gelatina de tangerina da Gama Zero, gelatina de amora da Gama Zero, gelatina com açúcar de ananás e gelatina com açúcar de maracujá.

As diversas amostras preparadas foram armazenadas a duas temperaturas diferentes: 4 °C, que representava a temperatura ideal de acondicionamento do produto e 25 °C, condição estudada com o objetivo de acelerar o tempo de vida das amostras e prever antecipadamente a sua degradação.

Todas as amostras de gelatina preparadas consoante o Método I, quer da gama zero, quer da gama açucarada, apresentaram sinais visíveis de contaminação, com presença macroscópica de bolores, após uma semana de armazenamento às temperaturas de 4 °C e de 25 °C, sendo, no entanto, esta contaminação mais evidente nas amostras armazenadas à temperatura de 25 °C (Figura 3.1).

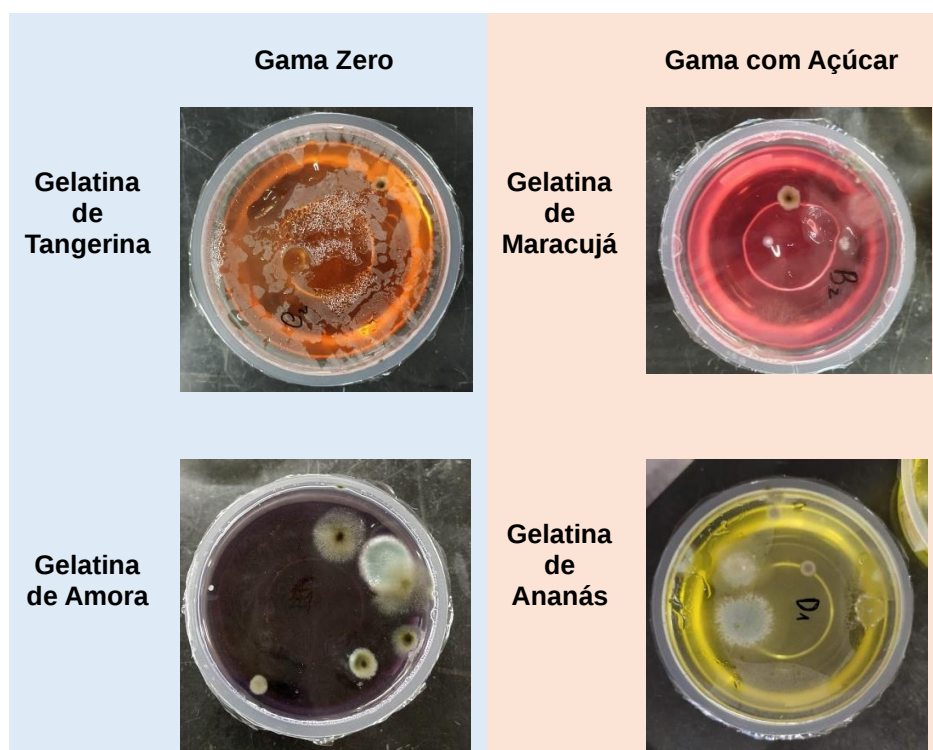


Figura 3.1 – Aspeto das amostras de gelatina preparadas de acordo com Método I após uma semana de armazenamento a 25 °C

O desenvolvimento de bolores e leveduras é possível em condições adversas, nomeadamente em ambientes com baixa temperatura, baixa atividade de água e baixo pH (pH < 3,5) (Jay et al., 2005). As gelatinas apresentam normalmente valores de pH

entre 3,0 e 4,0. Estes microrganismos encontram-se disseminados no meio ambiente e em produtos de origem vegetal, sendo que podem ser transferidos por contacto com equipamentos contaminados, exposição ao ar ou contaminantes existentes nos ingredientes utilizados na preparação das amostras. Os esporos produzidos por estes microrganismos podem ser resistentes a temperaturas elevadas o que dificulta a sua eliminação (Saraiva et al., 2019).

Níveis de leveduras superiores a 10^6 UFC/g de amostra podem conferir uma alteração no sabor da gelatina e níveis entre $10^6 - 10^7$ UFC/g de amostra podem causar a sua deterioração devido à produção de ácido e de gases (Saraiva et al., 2019). Uma vez que ficaram contaminadas após uma semana de armazenamento, as gelatinas preparadas de acordo o Método I não foram sujeitas a nenhum tipo de análise laboratorial nem sensorial, tendo sido imediatamente rejeitadas.

Assim, o Método I mostrou-se ineficaz em garantir o tempo de prateleira proposto (4 meses) para as amostras de gelatina, tanto da gama com açúcar como da gama zero. A elevada contaminação das amostras evidenciou a necessidade de proceder a alterações, quer no método de preparação como no método de embalagem das gelatinas. Assim, foi desenvolvido o Método II, que teve por base as seguintes propostas de alteração e melhoria em relação ao Método I:

- ⇒ Deixar a mistura ficar à temperatura de ebulição durante cinco minutos, de forma a garantir uma maior eficácia na inativação dos microrganismos e esporos que eventualmente estivessem presentes;
- ⇒ Armazenar amostras à temperatura de 13 °C de forma a testar a sua estabilidade durante uma possível quebra na cadeia de frio (transporte e distribuição de amostras);
- ⇒ Não adicionar água fria após a preparação do produto, ou seja, adicionar logo no início toda a água necessária para a preparação e deixar toda a água ferver durante cinco minutos;
- ⇒ Encher as embalagens até à sua capacidade máxima (180 mL) de modo a minimizar a quantidade de oxigénio disponível tentando, desta forma, limitar a possibilidade de desenvolvimento de fungos à superfície;
- ⇒ Distribuir a gelatina pelas embalagens imediatamente após o término da fervura e selar de imediato as embalagens, com o objetivo de diminuir a possibilidade de recontaminação durante o arrefecimento.

3.1.2. Pudins Prontos

No caso dos pudins, foram escolhidos apenas produtos da Gama Zero, nomeadamente o pudim flan e o pudim de chocolate, uma vez que a empresa só estava interessada em apostar nesta gama de pudins para comercializar na forma pronto a comer. Os dois pudins, preparados de acordo com o Método I e armazenados a 4°C, foram sujeitos a análises microbiológicas logo no dia seguinte ao seu embalamento (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Resultados das análises microbiológicas efetuadas aos pudins da gama zero, preparados de acordo com o Método I, após 24 horas de armazenamento a 4 °C.

<i>Parâmetros</i>	<i>Pudim Flan</i>	<i>Pudim de Chocolate</i>
	<i>Log UFC/g</i>	
<i>Microrganismos Totais a 30°C</i>	1,30 ± 0,00	3,62 ± 0,25
<i>Enterobacteriaceae</i>	< 1,0	2,23 ± 0,00
<i>Bolores e Leveduras</i>	< 1,0	< 1,0
<i>Psicrotróficos</i>	< 1,0	< 1,0

A observação dos resultados permite constatar, que logo no dia seguinte à sua preparação, as amostras de pudim, armazenadas a 4 °C, apresentaram sinais de contaminação, nomeadamente, contagens de microrganismos totais a 30 °C de 1,30 ± 0,00 Log UFC/g e 3,62 ± 0,25 Log UFC/g para o pudim flan e para o pudim de chocolate, respetivamente. A enumeração dos microrganismos totais a 30 °C constitui um fraco indicador de segurança alimentar, uma vez que não se correlaciona diretamente com a presença de toxinas ou de agentes patogénicos. No entanto, este ensaio pode ser útil para verificar as condições da matéria-prima, a eficácia dos procedimentos (ou seja, tratamento térmico) e condições de higiene durante o processamento, armazenamento e distribuição dos alimentos (FAO, 2016). Assim, a presença de microrganismos a 30 °C nas amostras de pudim pode refletir as condições a que estas foram sujeitas, nomeadamente, pode ter resultado da sua manipulação, das matérias-primas utilizadas e do ambiente envolvente à sua preparação/manipulação. Para além disso, a possível ocorrência de contaminações cruzadas, o insuficiente tratamento térmico, a hipotética contaminação através dos materiais de embalagem e a permanência prolongada das amostras, sem estarem seladas, durante o seu arrefecimento até cerca de 18 °C, poderá ter contribuído para a contaminação detetada.

Na legislação europeia não existem critérios microbiológicos para as refeições prontas a comer. Neste sentido, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) estabeleceu valores guia no que respeita aos critérios microbiológicos dos alimentos, que são reconhecidos a nível nacional e têm servido de base ao controlo de qualidade da restauração (Santos et al., 2005). Estes valores-guia foram recentemente revistos e atualizados pelo INSA, tendo em conta novos conhecimentos e o alargamento do seu âmbito (Saraiva et al., 2019). De acordo com esses valores guia, as sobremesas prontas de pudim são classificadas como alimentos totalmente cozinhados e não manuseados após tratamento térmico (Grupo 1). Quanto aos microrganismos a 30 °C, quando os valores são inferiores a 10^3 UFC/g o resultado é considerado satisfatório, quando se encontram entre 10^3 e 10^4 UCF/g o resultado é considerado questionável e, por fim, quando o valor é superior a 10^4 UFC/g o resultado é considerado não satisfatório (Saraiva et al., 2019). No presente estudo, é possível verificar, que no dia seguinte à sua preparação, e de acordo com os valores guia estabelecidos pelo INSA, o pudim de chocolate apresentou uma contagem de microrganismos a 30 °C que já é considerado questionável ($3,62 \pm 0,25$ Log UFC/g, ou seja entre 10^3 e 10^4 UCF/g), enquanto que o pudim flan se apresentou satisfatório ($1,30 \pm 0,00$ Log UFC/g, ou seja $< 10^3$ UCF/g).

As *Enterobacteriaceae* são bactérias gram-negativas, não formadoras de esporos, que se encontram amplamente distribuídas pelo ambiente, englobando bactérias naturalmente presentes no trato gastrointestinal do Homem e de outros animais. Estas bactérias estão igualmente presentes em matérias de origem vegetal. Assim, no grupo das *Enterobacteriaceae* encontram-se microrganismos inofensivos para o Homem, como é o caso de algumas estirpes comensais de *Escherichia coli*, microrganismos patogénicos para o Homem, como por exemplo *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, ou estirpes patogénicas de *E. coli* (por exemplo a *E. coli* O157:H7), microrganismos patogénicos oportunistas, como *Serratia* spp. e *Citrobacter* spp. A sua elevada disseminação pelo ambiente torna inevitável que alguns membros das *Enterobacteriaceae* entrem na cadeia alimentar, podendo, em alguns casos, originar doenças, bem como a deterioração dos alimentos (Baylis et al., 2011). Algumas *Enterobacteriaceae* são capazes de se desenvolver em temperaturas de refrigeração (4 °C). Este grupo de bactérias permite avaliar o estado higiénico das amostras e, quando presente em amostras que sofreram tratamento térmico (fervura), indica que este foi inadequado ou que ocorreu uma contaminação após processamento (Saraiva et al., 2019).

De acordo com os valores guia estabelecidos pelo INSA, para *Enterobacteriaceae*, a 37 °C, quando as análises apresentam valores inferiores a 10^2

UFC/g o resultado é considerado satisfatório, quando apresentam valores entre 10^2 - 10^3 UFC/g o resultado é considerado questionável e por fim, quando o valor é superior a 10^3 UFC/g o resultado é considerado não satisfatório (Saraiva et al. 2019). Mais uma vez, logo na semana de preparação de amostras o resultado para a contagem de colónias de *Enterobacteriaceae* mostrou-se questionável ($2,23 \pm 0,00$ UFC/g, ou seja, entre 10^2 - 10^3 UFC/g). Uma vez que as *Enterobacteriaceae* só foram detetadas no pudim de chocolate, os resultados sugerem que a presença destas bactérias não tenha resultado de quebras de higiene no processo, mas que esteja associada às características das matérias-primas utilizadas na produção deste pudim, sugerindo a necessidade de aumentar o tempo de fervura durante a sua preparação.

Após um dia de armazenamento a 4 °C não se observou a presença de bolores e leveduras ou de microrganismos psicrótrópicos em nenhuma das amostras. Os psicrótrópicos constituem um grupo de microrganismos capazes de crescer a temperaturas entre 0 e 7 °C, que têm normalmente o seu ótimo de crescimento entre os 20 e os 30 °C sendo que, em alguns casos, conseguem crescer até temperaturas de 43°C (Jay et al., 2005). Devido ao facto de conseguirem crescer a temperaturas baixas, os psicrótrópicos são um bom indicador de deterioração em géneros alimentícios conservados em refrigeração sendo, por isso, positiva a sua ausência nas amostras em estudo (Saraiva et al., 2019).

Tal como o verificado nas amostras de gelatina, ao fim de uma semana de armazenamento os pudins preparados de acordo com o Método I apresentavam, igualmente, sinais de contaminação visíveis, nomeadamente presença macroscópica de fungos à superfície. Além deste crescimento, os pudins apresentavam outros sinais de deterioração, nomeadamente, aroma desagradável, sinérese e empolamento da película de plástico, possivelmente como consequência da produção de gases pelos microrganismos presentes. Também no caso dos pudins, estas alterações foram mais visíveis nos pudins armazenados a 25 °C (Figura 3.2).

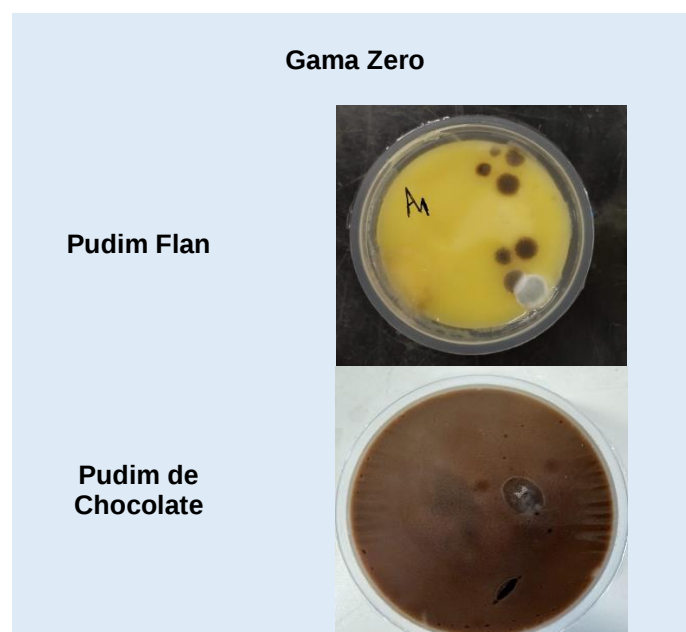


Figura 3.2 – Aspeto das amostras de pudim preparadas segundo o Método I, após uma semana de armazenamento a 25 °C.

A presença de aromas desagradáveis e de gases pode ser um resultado da atividade proteolítica e lipolítica dos bolores e leveduras, com possível e consequente acidificação das amostras (Cocolin et al., 2019). No entanto, a presença de gases e mau odor nas amostras de pudins da gama zero, mais incidente nas amostras de pudim de chocolate, pode também estar relacionada com o crescimento bacteriano. Num estudo de aplicação semelhante, Techer et al. (2020), observaram que a degradação microbiológica de sobremesas lácteas por bactérias, originava a produção de metabolitos, como ácidos orgânicos, particularmente os ácidos láctico e succínico, e diversos compostos voláteis, que podem originar alterações na aparência, textura e pH dos produtos, bem como o aparecimento de odores e de sabores indesejáveis.

O crescimento microbiano pode igualmente explicar a sinérese, isto é, o aparecimento de líquido na superfície do pudim. Com efeito, a diminuição do pH resultante do crescimento microbiano é um dos fatores que pode causar a sinérese em produtos lácteos (Vareltzis et al., 2016).

Uma vez que ficaram contaminados após uma semana de armazenamento, os pudins preparados pelo Método I não foram sujeitos a mais nenhum tipo de análise laboratorial e sensorial, tendo sido imediatamente rejeitados. Assim, tal como verificado com as gelatinas, também em relação aos pudins, o Método I mostrou-se ineficaz em garantir o tempo de prateleira proposto (2 meses), evidenciando a necessidade de proceder a alterações, quer no método de preparação quer no método de embalagem.

Assim, optou-se por aplicar aos pudins as mesmas alterações propostas para as gelatinas (Método II).

3.2. Análises de estabilidade das sobremesas preparadas de acordo o Método II

Conforme já referido, o Método II foi pensado com o objetivo de eliminar a contaminação microbiológica, através do aumento do tempo de fervura dos produtos, da diminuição do oxigénio disponível nas embalagens e do embalamento e selagem a quente das embalagens. O Método II foi aplicado a duas gelatinas, nomeadamente à gelatina de tangerina da gama zero e à gelatina de morango da gama com açúcar, e ao pudim de chocolate.

3.2.1. Gelatina de Tangerina da Gama Zero

A gelatina de tangerina zero, preparada de acordo com o Método II, foi armazenada a 4 °C, 13 °C e 25 °C. Todas as amostras foram sujeitas a análises regulares ao longo de 4 meses (16 semanas) de armazenamento (Tabelas 3.2 a 3.4).

Tabela 3.2 – Parâmetros analisados e periodicidade das análises efetuadas à gelatina de tangerina zero, preparada de acordo com o Método II e armazenada a 4 °C.

Parâmetros	Tempo (Semanas)																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
pH	A	-	-	-	A		-	-	-	A	-	-	A	-	-	A	-
Presença de Glúten	A ^{a)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cor	A	-	-	-	A	-	-	-	-	A	-	-	A	-	-	A	-
Microrganismos a 30°C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Bolores e Leveduras	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de Psicotróficos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Análise Sensorial	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Análise realizada; a) Analisado na formulação da gelatina; -: Análise não efetuada

Tabela 3.3 – Parâmetros analisados e periodicidade das análises efetuadas à gelatina de tangerina zero, preparada de acordo com o Método II e armazenada a 13 °C.

Parâmetros	Tempo (Semanas)																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
pH	A	-	-	-	A		-	-	A	-	-	-	A	-	-	-	-
Presença de Glúten	A ^{a)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cor	A	-	-	-	A	-	-	-	A	-	-	-	A	-	-	-	-
Microrganismos a 30°C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Bolores e Leveduras	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de Psicotróficos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Análise Sensorial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Análise realizada; a) Analisado na formulação da gelatina; -: Análise não efetuada

Tabela 3.4 – Parâmetros analisados e periodicidade das análises efetuadas à gelatina de tangerina zero, preparada de acordo com o Método II e armazenada a 25 °C.

Parâmetros	Tempo (Semanas)																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
pH	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Presença de Glúten	A ^{a)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cor	A	-	-	A	-	-	-	-	-	A	-	-	-	A	-	A	-
Microrganismos a 30°C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Bolores e Leveduras	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de Psicrotróficos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Análise Sensorial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Análise realizada; a) Analisado na formulação da gelatina; -: Análise não efetuada

Conforme é possível observar nas tabelas 3.2 a 3.4, as análises microbiológicas foram efetuadas com uma periodicidade semanal, durante 16 semanas, às amostras armazenadas às três diferentes temperaturas. Todas estas análises mostraram sempre ausência de contaminação em todos os parâmetros microbiológicos analisados (<1 log UFC/g).

Estes resultados mostram que as alterações introduzidas na elaboração do Método II permitiram alcançar os objetivos propostos (eliminação da contaminação

microbiológica). Assim a fervura da totalidade da amostra (2 L) durante 5 minutos, fez com que os diferentes microrganismos que pudessem estar presentes na sua formulação fossem eliminados. Com efeito, é sabido que quando sujeitas a temperaturas superiores a 100 °C a maioria das suas células vegetativas são instantaneamente destruídas (Adams & Moss, 2008).

Para avaliar a estabilidade físico-química das amostras mediu-se o pH (amostras armazenadas a 4 °C e a 13 °C) e a cor (amostras armazenadas a todas as temperaturas). De uma maneira geral, observou-se uma ligeira, mas significativa, diminuição ao longo do tempo nas duas gamas de temperatura. Como é possível observar na Figura 3.3 a diminuição do pH foi mais acentuada à temperatura de armazenamento de 4 °C, quando comparada com a diminuição ocorrida à temperatura de 13 °C. O pH é uma medida do carácter ácido ou alcalino de um produto, sendo que, quanto menor o valor de pH maior é o carácter ácido. Dias et al. (2011) observaram o mesmo comportamento em geleias de casca de banana-prata armazenadas a diferentes temperaturas. Os autores atribuíram essa diminuição à existência de uma libertação gradual de iões H^+ no meio devido ao ácido cítrico adicionado à formulação da geleia. Sendo que, no caso das gelatinas, pode estar a ocorrer uma situação semelhante.

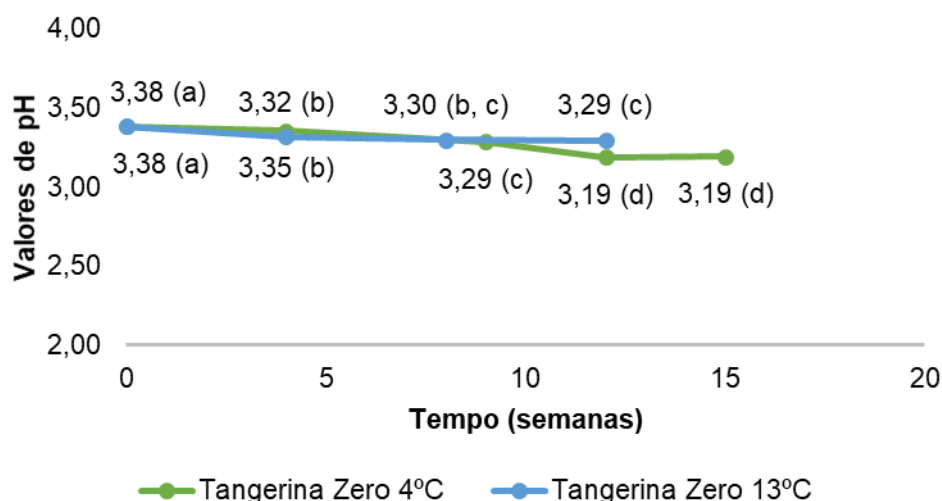


Figura 3.3 – Valores de pH ao longo do tempo para a gelatina zero tangerina armazenada a 4 °C e 13 °C. Valores médios $\pm$ desvio padrão de três réplicas da mesma amostra. Em cada curva letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diversos pontos ($p < 0,05$).

Na Tabela 3.5 é possível observar os valores de todos os parâmetros da cor para as amostras armazenadas às temperaturas de 4 °C, 13 °C e 25 °C. Observou-se uma variação bastante semelhante de todos os parâmetros da cor ao longo do armazenamento às diferentes temperaturas. No parâmetro L*, que faz referência à luminosidade das amostras, não se mostrou uma variação uniforme para nenhuma das temperaturas de armazenamento. O parâmetro a* diminuiu ao longo do tempo para as três temperaturas de armazenamento, o que corresponde a uma deslocação da tonalidade vermelha para o verde. Verificou-se, igualmente, que o valor do parâmetro b* foi decrescendo ao longo do tempo de armazenamento às três temperaturas, o que indica um desvio da tonalidade amarela para o azul. Posto isto, é possível afirmar que, tanto as amostras armazenadas em refrigeração (4 °C), como as amostras armazenadas a temperaturas mais altas (13°C e 25 °C), sofreram alterações semelhantes nos parâmetros da cor.

Tabela 3.5 – Variação dos parâmetros da cor L*, a*, b* e ΔE ao longo do tempo para a gelatina zero tangerina armazenada a 4 °C, 13 °C e 25 °C. Valores médios $\pm$ desvio padrão de três réplicas da mesma amostra

Tempo (semanas)	Temperatura de 4 °C			
	L*	a*	b*	ΔE
T0	37,02 $\pm$ 0,36 ^b	26,38 $\pm$ 0,53 ^a	27,95 $\pm$ 0,42 ^a	-
T4	36,14 $\pm$ 0,29 ^b	23,74 $\pm$ 0,47 ^b	24,92 $\pm$ 0,85 ^b	4,13 $\pm$ 0,89 ^c
T9	40,66 $\pm$ 1,05 ^a	21,59 $\pm$ 0,24 ^c	26,35 $\pm$ 0,76 ^{ab}	6,31 $\pm$ 0,34 ^b
T12	36,45 $\pm$ 0,64 ^b	18,24 $\pm$ 0,02 ^d	15,75 $\pm$ 0,24 ^c	14,69 $\pm$ 0,21 ^a
T15	35,06 $\pm$ 1,11 ^b	17,61 $\pm$ 0,44 ^d	15,02 $\pm$ 0,54 ^c	15,77 $\pm$ 0,79 ^a
	Temperatura de 13 °C			
	L*	a*	b*	ΔE
T0	37,02 $\pm$ 0,36 ^{bc}	26,38 $\pm$ 0,53 ^a	27,95 $\pm$ 0,42 ^a	-
T4	42,25 $\pm$ 1,02 ^a	21,58 $\pm$ 0,29 ^b	28,21 $\pm$ 0,83 ^a	7,17 $\pm$ 0,64 ^b
T8	34,72 $\pm$ 0,44 ^c	14,55 $\pm$ 0,37 ^c	17,27 $\pm$ 0,16 ^b	16,11 $\pm$ 0,16 ^a
T12	40,45 $\pm$ 2,38 ^{ab}	14,52 $\pm$ 0,26 ^c	17,43 $\pm$ 0,55 ^b	16,34 $\pm$ 0,16 ^a
	Temperatura de 25 °C			
	L*	a*	b*	ΔE
T0	37,02 $\pm$ 0,36 ^c	26,38 $\pm$ 0,53 ^a	27,95 $\pm$ 0,42 ^b	-
T3	41,86 $\pm$ 1,00 ^b	22,95 $\pm$ 0,78 ^b	28,55 $\pm$ 0,87 ^b	6,09 $\pm$ 0,43 ^c
T9	44,39 $\pm$ 0,42 ^a	16,64 $\pm$ 0,36 ^c	33,52 $\pm$ 0,77 ^a	13,45 $\pm$ 0,16 ^b
T13	39,95 $\pm$ 1,40 ^b	10,55 $\pm$ 0,34 ^d	18,36 $\pm$ 0,52 ^c	18,77 $\pm$ 0,52 ^a

Para cada amostra, letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

De uma maneira geral, a variação total de cor, dada pelos valores de ΔE , variou de forma significativa ao longo do tempo de armazenamento sendo essa variação mais acentuada com o aumento da temperatura de armazenamento ($\Delta E_{25^\circ C(T13)} = 18,77$, $\Delta E_{4^\circ C(T12)} = 14,69$ e $\Delta E_{13^\circ C(T12)} = 16,34$). Estes valores resultam da diminuição

significava de ambos os valores dos parâmetros a^* e b^* e sugerem uma alteração de cor, possível de observar a olho nu uma vez que todos os valores de ΔE se mostraram maiores que três (Liao et al., 2020). Este resultado foi igualmente observado em estudos de aplicação semelhante, em amostras de sumo de laranja, onde se observou que ao longo do tempo de armazenamento a cor amarelada se alterava gradualmente para uma cor acastanhada. No entanto, a alteração das cores e a degradação dos pigmentos são fenómenos complexos e nem sempre totalmente explicados (Liao et al., 2020; Torbica et al., 2016; Wibowo et al., 2015).

O crescimento microbiano constitui um fator que pode originar a alteração da cor da amostra (Baylis et al., 2011). Contudo, neste caso, uma vez que nunca se detetou crescimento microbiano nas amostras, a causa da descoloração terá de estar relacionada com outro fator, como a instabilidade dos pigmentos ou a ocorrência de reações químicas entre os constituintes das amostras que originam alteração da cor.

A temperatura acelera a maioria das reações de degradação química que levam à alteração e à perda de cor ao longo do tempo. As alterações estruturais que ocorrem após o tratamento térmico de um corante afetam as suas propriedades espectrais e aparência visual (Giménez et al., 2015). A gelatina de tangerina contém antocianinas e curcumina como corantes. As antocianinas apresentam, de um modo geral, instabilidade a diversos fatores como a luz, oxigénio, temperatura ou pH (Loypimai et al., 2016). Da mesma forma, a curcumina também apresenta instabilidade quando sujeita a temperatura elevada (Giménez et al., 2015). Desta forma, as condições mais severas de temperatura a que esta gelatina esteve sujeita podem ter afetado a estrutura dos corantes e ter contribuído para a alteração da cor verificada.

A amostra foi também avaliada para a presença de glúten, que possa surgir através da contaminação das matérias-primas. Neste sentido, esta análise foi realizada à formulação da gelatina em pó. O resultado desta análise revelou valores inferiores a 5,0 mg/kg de gliadina, valor inferior aos 20,0 mg/kg de glúten previstos por lei, podendo assim classificar as amostras como isentas de glúten (Parlamento Europeu; Conselho da União Europeia 2014).

A análise sensorial foi efetuada apenas às amostras armazenadas a 4 °C (Tabela 3.6 e Figura 3.4). Esta análise revelou que a gelatina não conseguiu manter as suas características organoléticas ao longo do tempo, verificando-se uma acentuada degradação de diversos atributos ao fim de sete semanas não tendo, por isso, sido possível efetuar as provas até às 16 semanas, como seria desejado.

Tabela 3.6 – Análise sensorial da gelatina zero de tangerina armazenada a 4°C preparada de acordo com o Método II (Valores médios $\pm$ desvio padrão).

		Parâmetros Sensoriais					
Tempo em semanas		Aspetto	Cor	Consistência	Sabor	Doçura	Acidez
	T0	5,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0 ^a	5,0 $\pm$ 0,0 ^a	5,0 $\pm$ 0,0 ^a	5,0 $\pm$ 0,0 ^a
	T1	5,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0 ^a	4,3 $\pm$ 0,4 ^{ab}	4,3 $\pm$ 0,4 ^{ab}	4,3 $\pm$ 0,4 ^{ab}
	T2	5,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0	4,0 $\pm$ 0,4 ^{ab}	4,0 $\pm$ 0,4 ^{ab}	3,8 $\pm$ 1,0 ^{ab}	3,6 $\pm$ 0,8 ^{ab}
	T3	5,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0	4,5 $\pm$ 0,7 ^{ab}	4,3 $\pm$ 0,4 ^{ab}	5,0 $\pm$ 0,0 ^a	5,0 $\pm$ 0,0 ^a
	T4	4,5 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 0,0	3,5 $\pm$ 0,8 ^{ab}	3,7 $\pm$ 0,7 ^{ab}	4,0 $\pm$ 0,3 ^{ab}	4,0 $\pm$ 0,3 ^{ab}
	T5	4,7 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0,0	3,5 $\pm$ 1,0 ^{ab}	3,5 $\pm$ 0,8 ^b	3,8 $\pm$ 0,5 ^{ab}	3,8 $\pm$ 0,7 ^{ab}
	T6	5,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,5 ^b	3,2 $\pm$ 0,4 ^b	4,0 $\pm$ 0,5 ^{ab}	3,8 $\pm$ 0,8 ^{ab}
	T7	5,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0	2,7 $\pm$ 0,4 ^b	2,7 $\pm$ 0,4 ^b	2,7 $\pm$ 0,4 ^b	2,7 $\pm$ 0,4 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

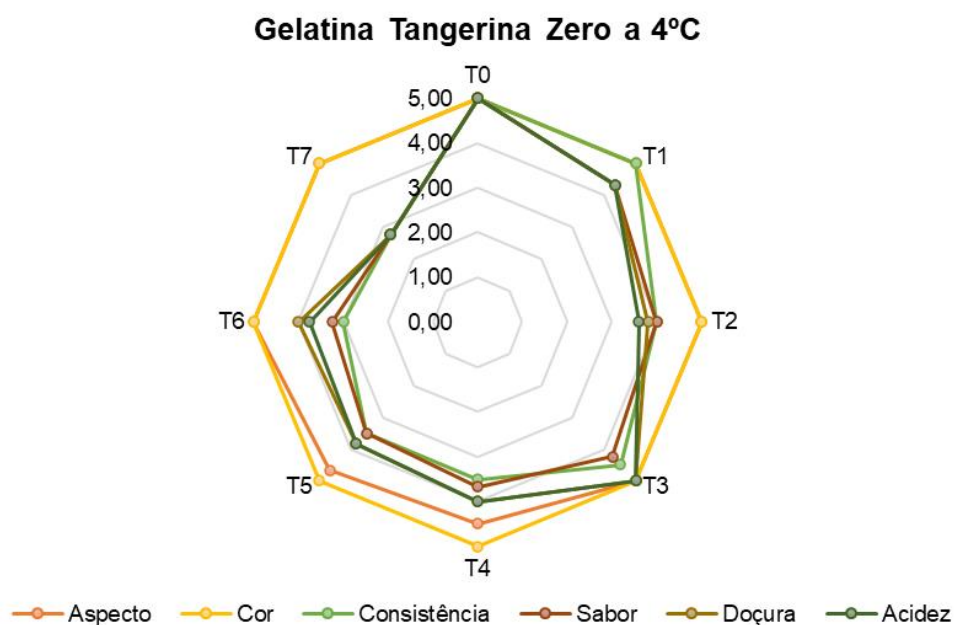


Figura 3.4 – Progressão da análise sensorial da gelatina de tangerina gama zero preparada de acordo com o Método II e armazenada a 4 °C ao longo de 7 semanas.

Apesar das alterações de cor que se verificaram na amostra armazenada a 4 °C ($\Delta E = 4,13 \pm 0,89$) logo ao fim de 4 semanas, os provadores não detetaram nenhuma alteração neste parâmetro, tendo-lhe atribuído sempre o máximo de pontuação. O mesmo se verificou para o parâmetro aspeto. O parâmetro doçura sofreu variações não significativas ao longo do tempo. Pelo contrário, a pontuação da gelatina nos

parâmetros consistência, sabor, e acidez sofreu um declínio significativo ao fim de 5 semanas, no caso do sabor, 6 semanas no caso da consistência, e 7 semanas no caso da acidez.

A tangerina é um fruto cítrico conhecido pelo seu sabor ácido e levemente adocicado. O painel de provadores ao fim das 7 semanas de provas sensoriais descreveu as amostras de gelatina de tangerina zero como demasiado doces, pouco ácidas, com um sabor a fruta demasiado madura e com perda da sua consistência característica. Esta degradação da consistência e do sabor das amostras de gelatina de tangerina poderá ser explicada pelas reações de hidrólise impulsionadas pelo elevado tempo a alta temperatura aplicado no Método II. As reações de hidrólise são reações pelas quais a água é capaz de degradar os componentes presentes nos alimentos, particularmente vitaminas e compostos fenólicos, podendo, desta forma, reduzir os seus benefícios nutricionais (Young & O'Sullivan 2011).

Concluindo, o Método II provou ser um método eficaz no controlo da contaminação microbiológica, conseguindo-se resultados bastante satisfatórios mesmo quando quebrada a cadeia de frio (13 e 25 °C). No entanto, com este método não se conseguiu a desejada estabilidade da cor, sabor e consistência da gelatina, mesmo quando conservada a 4 °C, pelo que houve necessidade de propor alterações na forma de preparação e embalagem. Assim, foi pensado o Método III, que teve por base as seguintes propostas de melhoria:

- ⇒ Diminuir o tempo de permanência a temperaturas elevadas de forma a minimizar a degradação dos constituintes da gelatina, reduzindo o tempo de fervura, arrefecendo mais rapidamente a gelatina através da adição de uma maior porção de água fria ($\approx 1\ 330\ \text{mL}$) e não selando as embalagens a uma temperatura tão elevada para facilitar o processo de arrefecimento;
- ⇒ Distribuir a gelatina pelas embalagens quando esta já tivesse atingido a temperatura de 25 a 30 °C e selar de imediato, para diminuir a possibilidade de recontaminação durante o tempo de arrefecimento nas embalagens abertas;
- ⇒ Não saturar as amostras até 180 ml e manter a quantidade comercial de 100 ml.

3.2.2. Gelatina de Morango da Gama com Açúcar

A gelatina de morango da gama com açúcar, preparada de acordo com o Método II, foi armazenada a 4 °C, 13 °C e 25 °C, tendo as amostras armazenadas a todas estas temperaturas sido sujeitas a análises regulares, ao longo de 4 meses (16 semanas) de armazenamento (Tabelas 3.7 a 3.9).

Tabela 3.7 – Parâmetros analisados e periodicidade das análises efetuadas à gelatina com açúcar de morango, preparada de acordo com o Método II e armazenada a 4 °C.

Parâmetros	Tempo (Semanas)																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
pH	A	-	-	-	A		-	-	-	A	-	-	-	A	-	-	A
Presença de Glúten	A ^{a)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cor	A	-	-	-	A	-	-	-	-	A	-	-	-	A	-	-	A
Microrganismos a 30°C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Bolores e Leveduras	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de Psicrotróficos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Análise Sensorial	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

A: Análise realizada; a) Analisado na formulação da gelatina; -: Análise não efetuada

Tabela 3.8 – Parâmetros analisados e periodicidade das análises efetuadas à gelatina com açúcar de morango, preparada de acordo com o Método II e armazenada a 13 °C.

Parâmetros	Tempo (Semanas)																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
pH	A	-	-	-	A		-	-	A	-	-	-	A	-	-	-	-
Presença de Glúten	A ^{a)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cor	A	-	-	-	A	-	-	-	A	-	-	-	A	-	-	-	-
Microrganismos a 30°C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Bolores e Leveduras	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de Psicrotróficos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Análise Sensorial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Análise realizada; a) Analisado na formulação da gelatina; -: Análise não efetuada

Tabela 3.9 – Parâmetros analisados e periodicidade das análises efetuadas à gelatina com açúcar de morango, preparada de acordo com o Método II e armazenada a 25 °C.

Parâmetros	Tempo (Semanas)																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
pH	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Presença de Glúten	A ^{a)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cor	A	-	-	A	-	-	-	-	-	A	-	-	-	A	-	-	-
Microrganismos a 30°C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Bolores e Leveduras	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de Psicotróficos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Análise Sensorial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Análise realizada; a) Analisado na formulação da gelatina; -: Análise não efetuada

Conforme é possível observar nas tabelas 3.7 a 3.9, as análises microbiológicas foram efetuadas com uma periodicidade semanal, durante 16 semanas, às amostras armazenadas às três diferentes temperaturas. Tal como verificado com a gelatina de tangerina, todas estas análises mostraram sempre ausência de contaminação em todos os parâmetros microbiológicos analisados (<1 log UFC/g). Estes resultados reforçam a ideia de que as alterações introduzidas na elaboração do Método II (ferver toda a água, aumentar o tempo de fervura e selagem a quente) permitiram a eliminação da contaminação microbiológica.

Para avaliar a estabilidade físico-química das amostras mediu-se o pH (amostras armazenadas a 4 °C e a 13 °C) e a cor (amostras armazenadas a todas as temperaturas). Tal como verificado para a gelatina de tangerina, de uma maneira geral, observou-se, igualmente uma ligeira, mas significativa diminuição ao longo do tempo de armazenamento nas duas gamas de temperaturas (Figura 3.5). Também à semelhança do que aconteceu com a gelatina zero de tangerina, a diminuição dos valores do pH foi mais acentuada para a temperatura de armazenamento de 4 °C, quando comparada com a temperatura de armazenamento de 13 °C. Mais uma vez, este resultado pode ser explicado pela libertação gradual de iões H⁺ no meio devido aos ácidos adicionados à formulação das gelatinas (Dias et al., 2011).

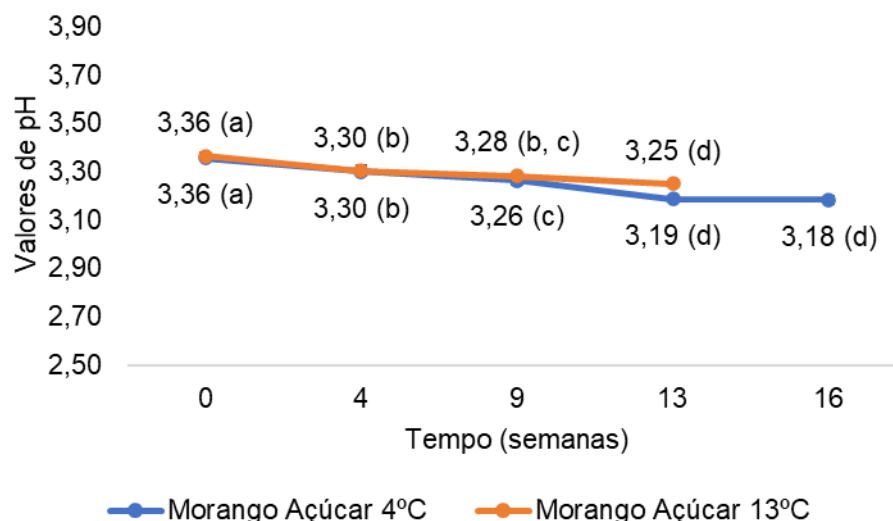


Figura 3.5 – Valores de pH ao longo do tempo para a gelatina com açúcar de morango armazenada a 4 °C e 13 °C. Valores médios $\pm$ desvio padrão de três réplicas da mesma amostra. Em cada curva letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diversos pontos ($p < 0,05$).

Na Tabela 3.10 é possível observar os valores de todos os parâmetros da cor para as amostras armazenadas às temperaturas de 4 °C, 13 °C e 25 °C. Tal como se observou nas amostras de gelatina de tangerina zero, o parâmetro L^* para a gelatina de morango, não mostrou uma variação uniforme ao longo do tempo. Da mesma forma, a variação do parâmetro a^* , mostrou um decréscimo ao longo do tempo o que indica que as amostras foram perdendo gradualmente a sua tonalidade vermelha. O parâmetro b^* também apresentou uma tendência para diminuir ao longo do armazenamento, o que indica um desvio da tonalidade amarela para o azul. Posto isto, à semelhança dos resultados obtidos com a gelatina de tangerina, é possível afirmar que, tanto as amostras armazenadas em refrigeração, como as amostras armazenadas a temperaturas mais altas, sofreram alterações nos parâmetros da cor.

Tabela 3.10 – Variação dos parâmetros da cor L*, a*, b* e ΔE ao longo do tempo para a gelatina com açúcar de morango armazenada a 4 °C, 13 °C e 25 °C. Valores médios ± desvio padrão de três réplicas da mesma amostra

Tempo (semanas)	Temperatura de 4 °C			
	L*	a*	b*	ΔE
T0	26,54 ± 0,32 ^b	27,94 ± 0,41 ^b	11,73 ± 0,12 ^a	-
T4	23,05 ± 0,11 ^c	30,25 ± 0,88 ^a	10,39 ± 0,59 ^b	4,16 ± 0,21 ^c
T9	29,69 ± 0,06 ^a	26,06 ± 0,40 ^c	9,10 ± 0,27 ^c	4,52 ± 0,29 ^c
T13	21,96 ± 0,54 ^d	21,24 ± 0,60 ^d	6,35 ± 0,68 ^d	9,74 ± 1,03 ^b
T16	21,74 ± 0,29 ^d	18,62 ± 0,28 ^e	5,32 ± 0,12 ^d	12,29 ± 0,25 ^a
	Temperatura de 13 °C			
	L*	a*	b*	ΔE
T0	26,54 ± 0,32 ^b	27,94 ± 0,41 ^a	11,73 ± 0,12 ^a	-
T4	30,14 ± 1,07 ^a	30,34 ± 0,59 ^a	11,18 ± 0,60 ^a	4,41 ± 1,10 ^b
T8	23,66 ± 0,29 ^c	20,20 ± 0,32 ^b	7,43 ± 0,45 ^b	9,32 ± 0,17 ^a
T12	25,26 ± 0,60 ^{bc}	21,65 ± 1,69 ^b	6,46 ± 0,58 ^b	8,34 ± 1,58 ^a
	Temperatura de 25 °C			
	L*	a*	b*	ΔE
T0	26,54 ± 0,32 ^c	27,94 ± 0,41 ^{ab}	11,73 ± 0,12 ^c	-
T3	31,43 ± 1,29 ^b	26,74 ± 11,03 ^b	10,23 ± 0,72 ^c	5,38 ± 1,05 ^a
T9	34,57 ± 0,31 ^a	29,43 ± 16,87 ^a	16,54 ± 0,35 ^a	9,50 ± 0,21 ^b
T13	28,51 ± 1,04 ^c	20,85 ± 9,41 ^c	8,82 ± 0,53 ^d	7,97 ± 0,17 ^b

Para cada amostra, letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

De uma maneira geral, a variação total de cor, dada pelos valores de ΔE, variou de forma significativa ao longo do tempo de armazenamento, de uma forma semelhante para todas as temperaturas de armazenamento. Estes valores resultam da diminuição significativa de ambos os valores dos parâmetros a* e b* e sugerem uma alteração de cor, possível de observar a olho nu uma vez que todos os valores de ΔE se mostraram superiores a três (Liao et al., 2020).

A variação da cor das amostras pode estar relacionada com a instabilidade dos corantes (antocianinas, carminas e betacarotenos), que pode ter sido acelerada pela intensidade do tratamento térmico aplicado. A variação da cor pode também estar relacionada com a ocorrência de reações químicas entre os constituintes das amostras. Descarta-se aqui a hipótese de resultar da atividade de microrganismos uma vez que não se verificaram contaminações microbiológicas nas amostras. Apesar de, tanto a gelatina de tangerina como a gelatina de morango terem apresentado variações na cor, comparando essa variação para o mesmo tempo e temperatura de armazenamento, é possível verificar que a variação total de cor para a gelatina de morango foi muito menos acentuada do que a verificada na gelatina de tangerina (Tabelas 3.6 e 3.10), sugerindo uma maior estabilidade desta formulação (gelatina de morango).

Tal como verificado para a gelatina de tangerina, também a formulação da gelatina de morango apresentou valores inferiores a 5,0 mg/kg de gliadina, valor inferior aos

20,0 mg/kg de glúten estipulado por lei, no ensaio da presença de glúten, podendo assim classificar as amostras como isentas de glúten (Parlamento Europeu; Conselho da União Europeia 2014).

A análise sensorial foi efetuada apenas para as amostras armazenadas a 4 °C, (Tabela 3.11), ao longo de dezasseis semanas (T16). Na Figura 3.6 é possível observar que ao longo do tempo a avaliação para os parâmetros sensoriais foi diminuindo ligeiramente ao longo do tempo, sendo esta diminuição mais acentuada para os parâmetros do sabor e doçura, onde se verificaram pontuações médias inferiores a 3. No entanto, como o sabor do morango está muitas vezes associado a um sabor de fruto mais amadurecido, adocicado e pouco ácido, foi possível efetuar as provas de análise sensorial até às 16 semanas, ainda que as pontuações aos diferentes parâmetros fossem diminuindo com o passar do tempo. À semelhança do que aconteceu com a gelatina de tangerina, a degradação dos parâmetros sensoriais e da cor da gelatina de morango poderá ser igualmente explicada pelas reações de hidrólise impulsionadas pelas altas temperaturas do Método II (Young & O'Sullivan, 2011).

Tabela 3.11 - Resultados da análise sensorial ao longo do tempo para a gelatina com açúcar de morango preparada de acordo com o Método II e armazenada a 4 °C

<i>Parâmetros Sensoriais</i>							
<i>Tempo em semanas</i>	<i>Aspetto</i>	<i>Cor</i>	<i>Consistência</i>	<i>Sabor</i>	<i>Doçura</i>	<i>Acidez</i>	
	T0	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a
	T1	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a
	T2	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	4,6±0,6 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a
	T3	4,8±0,4 ^a	5,0±0,0 ^a	4,5±0,8 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a
	T4	4,5±0,7 ^{ab}	5,0±0,0 ^a	4,0±1,0 ^a	4,7±0,4 ^{abc}	4,7±0,4 ^{ab}	4,5±0,5 ^{ab}
	T5	4,8±0,3 ^a	5,0±0,0 ^a	4,0±1,3 ^a	4,8±0,3 ^{ab}	4,8±0,4 ^{ab}	4,7±0,4 ^{ab}
	T6	5,0±0,0 ^a	4,8±0,4 ^{ab}	4,0±1,0 ^a	3,8±0,4 ^{bcde}	4,3±1,1 ^{ab}	4,3±1,1 ^{ab}
	T7	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	3,5±1,0 ^a	4,3±0,8 ^{abcd}	4,0±1,0 ^{ab}	4,0±1,0 ^{ab}
	T8	5,0±0,0 ^a	5,0±0,0 ^a	4,0±0,8 ^a	4,6±0,6 ^{abc}	4,6±0,6 ^{ab}	4,4±0,7 ^{ab}
	T9	5,0±0,0 ^a	4,2±0,6 ^{ab}	3,7±1,0 ^a	3,8±0,7 ^{bcde}	4,2±1,0 ^{ab}	4,1±0,9 ^{ab}
	T10	4,4±0,5 ^{ab}	3,8±0,7 ^{ab}	3,8±0,6 ^a	4,0±0,0 ^{abcd}	4,4±0,5 ^{ab}	4,4±0,5 ^{ab}
	T11	4,8±0,3 ^a	4,0±0,4 ^{ab}	3,4±0,9 ^a	4,0±0,0 ^{abcd}	4,4±0,5 ^{ab}	4,4±0,5 ^{ab}
	T12	4,8±0,4 ^a	3,8±0,7 ^{ab}	3,5±0,8 ^a	3,5±0,5 ^{bcde}	4,5±0,5 ^{ab}	4,0±0,0 ^{ab}
	T13	4,3±0,4 ^{ab}	3,8±0,4 ^{ab}	3,3±0,4 ^a	3,8±0,4 ^{bcde}	4,0±1,0 ^{ab}	3,5±0,8 ^{ab}
	T14	4,0±0,5 ^{ab}	3,8±0,7 ^{ab}	3,3±0,4 ^a	2,5±0,5 ^e	2,8±0,4 ^c	3,0±0,5 ^b
	T15	4,0±0,7 ^{ab}	3,7±0,4 ^{ab}	3,7±0,4 ^a	2,7±0,4 ^{de}	3,0±0,0 ^{bc}	3,3±0,4 ^{ab}
	T16	3,5±0,5 ^b	3,5 ± 0,5 ^b	3,3±0,4 ^a	3,3±0,4 ^{cde}	3,0±0,0 ^{bc}	3,3±0,4 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05)

Gelatina Morango com Açúcar a 4°C

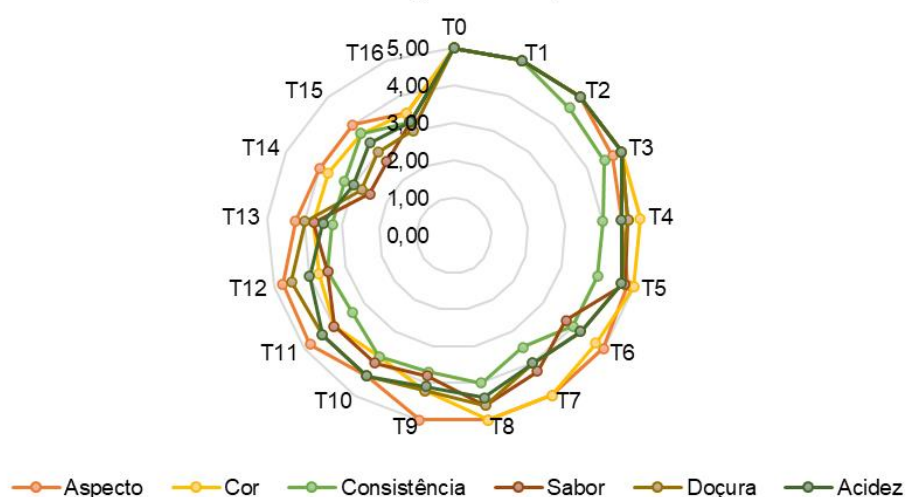


Figura 3.6 – Progressão da análise sensorial da gelatina de morango da gama com açúcar preparada de acordo com o Método II e armazenada a 4°C ao longo de 16 semanas

Concluindo, tal como verificado para a gelatina zero de tangerina, o Método II também provou ser um método eficaz no controlo da contaminação microbiológica no ensaio realizado com a gelatina com açúcar de morango, conseguindo-se resultados bastante satisfatórios ao longo dos quatro meses de armazenamento, mesmo se quebrada a cadeia de frio (13 e 25 °C). No entanto, ao contrário do observado para a gelatina zero de tangerina, as características organoléticas da gelatina com açúcar de morango mostraram uma maior estabilidade durante todo o período do ensaio. Desta forma, o Método II parece poder ser aplicado a esta formulação de gelatina.

3.2.3. Pudim de Chocolate da Gama Zero

O pudim zero de chocolate, preparado de acordo com o Método II, foi armazenado a 4 °C e analisado regularmente, ao longo de 2 meses (8 semanas) (Tabela 3.12).

Tabela 3.12 – Parâmetros analisados e periodicidade das análises efetuadas ao pudim zero de chocolate preparada de acordo com o Método II e armazenado a 4 °C.

Parâmetros	Tempo (Semanas)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	A	A	-	-	-	-	-	-	-
Presença de Glúten	A ^{a)}	-	-	-	-	-	-	-	-
Cor	A	-	-	-	A	-	-	-	A
Microrganismos a 30°C	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Bolores e Leveduras	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de Psicrotróficos	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Análise Sensorial	A	A	-	-	-	-	-	-	-

A: Análise realizada; a) Analisado na formulação do pudim; -: Análise não efetuada

Ao contrário do que se verificou com as amostras de gelatina, no caso do pudim de chocolate o Método II não conseguiu evitar o aparecimento de contaminações nas amostras (Tabela 3.13). Com efeito, logo na semana de preparação das amostras foi possível detetar níveis de microrganismos totais a 30 °C, superiores a 10^3 UFC/g (3,3 log UFC/g), ou seja, acima do limite satisfatório (Saraiva et al., 2019). Ao longo do tempo o nível de contaminação por microrganismos totais a 30 °C foi aumentado observando-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Até às duas semanas de armazenamento, as amostras apresentaram um número de unidades formadoras de colónias (UFC) por grama que as classifica como tendo uma qualidade questionável, ou seja, o resultado analítico é superior ao valor máximo recomendado (10^3 UFC/g) e inferior ou igual ao valor máximo admissível (10^4 UFC/g). A partir da terceira semana de armazenamento o grau de contaminação das amostras atingiu valores acima de 10^4 UFC/g, tratando-se estes de valores que as classifica como tendo uma qualidade não satisfatória (Saraiva et al., 2019). Em nenhum dos tempos avaliados se mostrou positiva a presença de *Enterobacteriaceae*, microrganismos psicotróficos ou bolores e leveduras.

Tabela 3.13 – Resultados microbiológicos em Log UFC/g obtidos para o pudim zero de chocolate preparado de acordo com o Método II e armazenado a 4 °C

	<i>Tempo em semanas</i>	<i>Microrganismos Totais Log UFC/g</i>	<i>Enterobacteriaceae Log UFC/g</i>	<i>Bolores e Leveduras Log UFC/g</i>	<i>Psicrotróficos Log UFC/g</i>
Pudim Zero de Chocolate	T0	3,30 ± 0,00 ^c	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T1	3,10 ± 0,18 ^c	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T2	3,00 ± 0,00 ^c	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T3	6,38 ± 0,23 ^b	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T4	7,43 ± 0,21 ^a	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T5	6,38 ± 0,23 ^b	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T6	7,50 ± 0,20 ^a	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T7	5,90 ± 0,41 ^b	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T8	7,20 ± 0,36 ^a	< 1,0	< 1,0	< 1,0

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05)

O pudim zero de chocolate apresenta várias características, particularmente a disponibilidade em nutrientes e o valor de pH, que o podem tornar mais suscetível ao crescimento microbiano, quando comparado com as gelatinas. Está bem estabelecido que a maioria dos microrganismos cresce melhor a valores de pH em torno de 7,0 (6,6-7,5), enquanto poucos conseguem crescer abaixo de 4,0 (Jay et al., 2005). Assim, o facto de o pudim de chocolate ter apresentado um valor de pH próximo da neutralidade ($6,4 \pm 0,01$, após preparação e $6,43 \pm 0,02$, após uma semana de armazenamento a 4 °C) e as gelatinas valores mais ácidos ($\text{pH} < 3,50$), pode ajudar a explicar os resultados obtidos. Por outro lado, o pudim é mais rico em nutrientes, nomeadamente em aminoácidos e açúcares (lactose), uma vez que tem leite na sua constituição (Jay et al., 2005). A presença do chocolate pode ser outro ponto a contribuir para a contaminação verificada. Trabalhos em que se analisaram diferentes amostras de leite com e sem chocolate, revelaram que, 14 dias após o tratamento térmico, a contagem de microrganismos mesófilos totais era superior nos leites com chocolate do que nos leites simples, mesmo quando as contagens iniciais eram idênticas. Os autores concluíram que as contagens superiores não se deviam a contaminações provenientes do chocolate em pó *per se*, mas que o chocolate estimulava o crescimento microbiano (Jay et al., 2005).

Em relação à cor (Tabela 3.14), observaram-se variações significativas dos parâmetros a^* (desvio para o verde) e b^* (desvio para o azul), após 4 semanas de armazenamento, no entanto, entre as 4 e as 8 semanas os valores estabilizaram. O mesmo se verificou em relação à variação de cor total das amostras (ΔE). Apesar de se

ter verificado uma variação total de cor da amostra, esta teve um valor relativamente baixo, e no limiar daquilo que se considera ser possível de detetar a olho nu (Liao et al., 2020).

Tabela 3.14 – Variação dos parâmetros da cor L*, a*, b* e ΔE ao longo do tempo para o pudim zero de chocolate armazenado a 4 °C. Valores médios $\pm$ desvio padrão de três réplicas da mesma amostra

Tempo (semanas)	Temperatura de 4 °C			
	L*	a*	b*	ΔE
T0	38,97 $\pm$ 1,32 ^a	11,09 $\pm$ 0,69 ^a	12,07 $\pm$ 0,71 ^a	-
T4	39,16 $\pm$ 0,50 ^a	9,52 $\pm$ 0,38 ^b	9,09 $\pm$ 0,61 ^b	3,40 $\pm$ 0,71 ^a
T8	39,52 $\pm$ 0,08 ^a	9,44 $\pm$ 0,08 ^b	9,15 $\pm$ 0,06 ^b	3,40 $\pm$ 0,08 ^a

Para cada amostra, letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05)

A análise à presença de glúten na formulação do pudim zero de chocolate revelou valores inferiores a 5,0 mg/kg de gliadina, valor inferior aos 20,0 mg/kg de glúten previstos por lei, podendo assim classificar as amostras como isentas de glúten (Parlamento Europeu; Conselho da União Europeia 2014).

O pudim zero de chocolate preparado de acordo com o Método II foi analisado sensorialmente durante 3 semanas (semana da preparação, T0) e ao fim de duas semanas de armazenamento a 4 °C (T1 e T2). A elevada contaminação microbiológica detetada inviabilizou a continuação da análise. Os resultados obtidos (Tabela 3.15 e Figura 3.7), permitiram observar a inexistência de diferenças significativas entre as pontuações dadas pelo painel aos vários atributos em avaliação nas duas primeiras semanas de avaliação (T0 e T1). Contudo, após duas semanas de armazenamento, verificou-se uma diminuição acentuada dos parâmetros aspeto e textura, observando-se diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). O rápido declínio nas pontuações sensoriais destes parâmetros, pode ser explicado pelo surgimento de aguadilha na superfície do pudim, que afetou o aspeto e a textura do mesmo. Também se verificou uma tendência para a diminuição das pontuações atribuídas aos parâmetros sabor e doçura. Para além dos parâmetros em avaliação o painel registou, igualmente, o aparecimento de mau odor nas amostras ao fim das duas semanas de armazenamento a 4 °C. Estas alterações de sabor e de odor podem ter sido induzidas pelos metabolitos resultantes da presença de microrganismos nas amostras de pudim (Muir 2011).

Tabela 3.15 - Resultados da Análise Sensorial efetuada ao longo do tempo ao pudim zero de chocolate preparado de acordo com o Método II e armazenado a 4 °C

Parâmetros Sensoriais						
Tempo em semanas		Aspetto	Cor	Sabor	Doçura	Textura
	T0	5,0 ±0,0 ^a	5,0 ±0,0 ^a	3,9 ±0,7 ^a	4,3 ±0,8 ^a	5,0 ±0,0 ^a
	T1	5,0 ±0,0 ^a	5,0 ±0,0 ^a	4,3 ±0,8 ^a	4,3 ±0,8 ^a	4,8 ±0,4 ^a
	T2	3,2 ±0,7 ^b	4,0 ±0,4 ^a	2,8 ±0,6 ^a	3,6 ±1,1 ^a	2,8 ±0,3 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05)

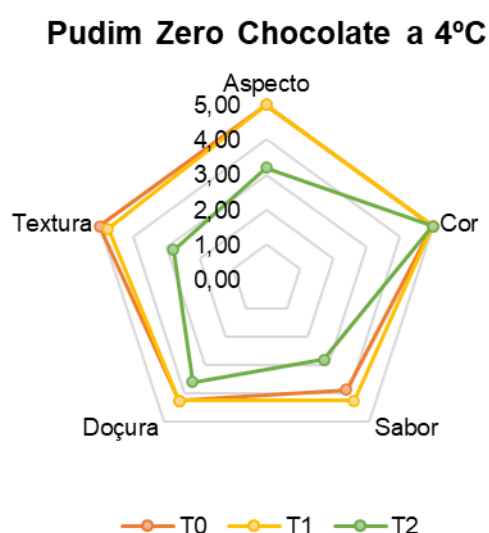


Figura 3.7 – Progressão da análise sensorial ao longo de duas semanas do pudim zero de chocolate preparado de acordo com Método II e armazenado a 4 °C.

Com forma de conclusão, ao contrário do verificado para as gelatinas, o Método II não se mostrou eficaz no controlo da contaminação microbiológica do pudim zero de chocolate. Ademais, também ao contrário do verificado com as gelatinas, o painel de provadores, logo na semana de preparação não atribuiu o máximo de pontuação ao sabor e à doçura do pudim. O facto de a embalagem ter sido selada com o pudim a uma temperatura muito elevada pode ter contribuído para a degradação do seu sabor. Assim, decidi baixar-se a temperatura de selagem. Contudo, essa alteração iria, muito provavelmente, agravar o problema da contaminação microbiológica. Assim, e sabendo que o chocolate poderia estar a potenciar o crescimento microbiano nos pudins, decidi-se também alterar a fórmula, reduzindo a percentagem de chocolate através do aumento da percentagem de leite.

3.3. Análises de estabilidade das sobremesas preparadas de acordo o Método III

O Método III foi aplicado apenas aos produtos que não apresentaram bons resultados com o Método II, ou seja, à gelatina de tangerina da gama zero e ao pudim zero de chocolate.

3.3.1. Gelatina de Tangerina da Gama Zero

As amostras de gelatina de tangerina da gama zero, preparadas de acordo com o Método III foram avaliadas ao longo de nove semanas de armazenamento a 4 °C (Tabela 3.16).

Tabela 3.16 – Parâmetros analisados e periodicidade das análises efetuadas à gelatina zero de tangerina preparada de acordo com o Método III e armazenado a 4 °C.

Parâmetros	Tempo (Semanas)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Presença de Glúten	A ^{a)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microorganismos a 30°C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Bolores e Leveduras	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de Psicotróficos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Análise Sensorial	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

A: Análise realizada; a) Analisado na formulação do pudim; -: Análise não efetuada

As amostras foram apenas avaliadas até às 9 semanas e não até às 16, como seria desejado, porque se verificou o aparecimento de contaminação com bolores e leveduras ao fim de 9 semanas de armazenamento a 4 °C (Tabela 3.17).

Tabela 3.17 – Resultados microbiológicos em Log UFC/g obtidos para a gelatina de tangerina da gama zero preparada de acordo com o Método III e armazenada a 4 °C

	<i>Tempo em semanas</i>	<i>Microrganismos Totais Log UFC/g</i>	<i>Enterobacteriaceae Log UFC/g</i>	<i>Bolores e Leveduras Log UFC/g</i>	<i>Psicrotróficos Log UFC/g</i>
Gelatina Zero de Tangerina	T0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T1	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T2	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T3	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T4	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T6	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T7	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T8	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	T9	< 1,0	< 1,0	2,32±0,03	< 1,0

Os valores-guia fornecidos pelo INSA afirmam que para as leveduras, valores inferiores a 10^2 UFC/g são considerados resultados aceitáveis, valores entre 10^2 - 10^3 UFC/g são considerados resultados questionáveis e valores superiores a 10^3 UFC/g são considerados resultados não satisfatórios. Por outro lado, para os bolores, valores inferiores a 5×10^2 UFC/g são considerados resultados aceitáveis, valores entre 5×10^2 - 10^3 UFC/g são considerados resultados questionáveis e por fim, valores superiores a 10^3 UFC/g são considerados não satisfatórios (Saraiva et al., 2019). Tal como já referido, o meio DRBC contém o corante *rose bengal* que é facilmente assimilado pelas leveduras, fazendo com que estas coram de rosa, o que facilita a sua diferenciação dos bolores (BIOKAR, 2020b). A observação das placas de Petri permitiu verificar que as colónias presentes correspondiam apenas a bolores. Assim, segundo os valores-guia do INSA, a qualidade da gelatina ao fim de 9 semanas ainda era considerada aceitável (T9 = $2,32 \pm 0,03$ Log UFC/g $< 5 \times 10^2$ UFC/g). Apesar disso, o ensaio acabou por ser interrompido, uma vez que, na semana seguinte, as amostras já apresentavam bolores visíveis. Não foi detetada a presença de mais nenhum dos restantes microrganismos pesquisados. Estes resultados sugerem duas possibilidades, ou as condições de aquecimento do Método III não foram suficientemente severas para assegurar a destruição eficaz dos microrganismos presentes na formulação inicial, ou, durante o arrefecimento/embalamento das amostras não se conseguiram assegurar as condições de assepsia desejadas, tendo, nessa fase, ocorrido a recontaminação da gelatina. Para descartar esta última hipótese, seria desejável repetir este método, assegurando uma total esterilidade durante o arrefecimento e embalamento das amostras, por exemplo, através da realização destas operações em câmara de fluxo laminar.

Na formulação da amostra, mais uma vez, se observaram valores inferiores a 5,0 mg/kg de gliadina, ou seja, um valor inferior aos 20,0 mg/kg de glúten previstos por lei, podendo assim classificar as amostras como isentas de glúten (Parlamento Europeu; Conselho da União Europeia 2014).

Quanto à análise sensorial é possível constatar que, ao contrário da gelatina de tangerina preparada de acordo com o Método II, estas amostras obtiveram pontuações bastante altas em todos os parâmetros sensoriais, dado que não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre si (Tabela 3.18 e Figura 3.8). No caso do Método III, o valor médio mais baixo a ser pontuado foi de 4,5 para os parâmetros da doçura, acidez e aspeto.

Tabela 3.18 – Valores médios e de desvio padrão da análise sensorial da gelatina zero de tangerina preparada de acordo com o Método III e armazenada a 4°C

<i>Parâmetros Sensoriais</i>							
<i>Tempo em semanas</i>		Aspeto	Cor	Consistência	Sabor	Doçura	Acidez
	T0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0
	T1	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0
	T2	4,5 ±0,7	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	4,5 ±0,7	5,0 ±0,0
	T3	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	4,5 ±0,7	5,0 ±0,0
	T4	4,5 ±0,7	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	4,7±0,4
	T5	4,7±0,4	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	4,5 ±0,7	5,0 ±0,0
	T6	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	4,7±0,4	5,0 ±0,0
	T7	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0
	T8	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	4,5 ±0,7
	T9	5,0 ±0,0	5,0 ±0,0	4,7±0,4	5,0 ±0,0	4,7±0,4	4,7±0,4

Gelatina Tangerina Zero a 4°C

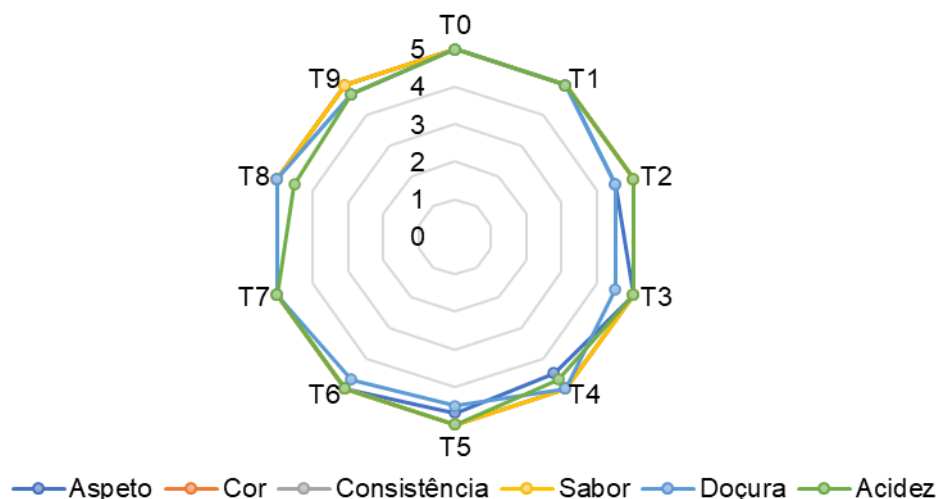


Figura 3.8 - Progressão da análise sensorial da gelatina zero de tangerina ao longo de 9 semanas preparada de acordo com o Método III e armazenada a 4 °C.

Estes resultados sugerem que o terceiro modo de preparação de amostras (Método III) foi o que resultou melhor para a gelatina zero de tangerina, uma vez que ao contrário do segundo modo de preparação, este manteve as suas propriedades sensoriais ótimas ao longo de 9 semanas. Este resultado reforça ainda mais a necessidade de, tal como já referido, repetir este ensaio assegurando um controlo mais apertado das condições de assepsia durante o arrefecimento e embalamento, de forma a tentar assegurar a estabilidade microbiológica das amostras. Caso se conseguisse alcançar essa estabilidade, seria então possível analisar as amostras em termos sensoriais ao longo de 4 meses (16 semanas) e, assim, confirmar se o Método III permite ou não a manutenção das características da gelatina ao longo de todo o tempo desejado para a sua validade (4 meses).

3.3.2. Pudins de Chocolate da Gama Zero Formulações A e B

As formulações A e B do pudim zero de chocolate diferenciaram-se das formulações anteriormente preparadas, pelo aumento da quantidade percentual de leite meio-gordo em pó. Em relação à formulação original, a formulação A sofreu um aumento de 7,0% para 9,8% e a formulação B sofreu um aumento de 7,0% para 14,0%. Este aumento surgiu com o objetivo de diminuir a percentagem de cacau na mistura, de forma a tentar reduzir a existência de contaminações. No entanto, esta alteração da

formulação não resultou como o esperado. Logo na semana de preparação das amostras (T0), observou-se a presença de aguadilha à superfície, de gases e de maus odores. A análise microbiológica (Tabela 3.19) revelou a existência de microrganismos a 30 °C em níveis ainda satisfatórios, mas demasiado elevados para garantir o tempo de vida útil do produto.

Tabela 3.19 – Resultados microbiológicos em Log UFC/g obtidos para os pudins da gama zero preparados de acordo com o Método III e armazenados a 4 °C

	<i>Tempo em semanas</i>	<i>Microrganismos Totais Log UFC/g</i>	<i>Enterobacteriaceae Log UFC/g</i>	<i>Bolores e Leveduras Log UFC/g</i>	<i>Psicrotróficos Log UFC/g</i>
<i>Pudim Chocolate Formulação A</i>	T0	2,76±0,56	< 1,0	< 1,0	< 1,0
<i>Pudim Chocolate Formulação B</i>		2,60±0,70	< 1,0	< 1,0	< 1,0

Tal como referido anteriormente, o pudim de chocolate apresenta várias características, particularmente a disponibilidade em nutrientes e o pH, que o podem tornar mais suscetível ao crescimento microbiano, quando comparado com as gelatinas (Jay et al., 2005).

A estabilidade microbiológica dos pudins, iria ser mais facilmente atingida, com a adição de conservantes que tivessem a capacidade de atrasar ou inibir a contaminação por microrganismos e, desta forma, evitassem a degradação precoce das amostras. A adição de conservantes iria prevenir o desenvolvimento de bolores, leveduras e bactérias evitando, desta forma, a possível formação de toxinas (Muir, 2011; Young & O'Sullivan, 2011). No entanto, atendendo à regulamentação atualmente em vigor, a adição de conservantes ao grupo de sobremesas prontas à base de produtos lácteos é extremamente limitada tornando-se desta forma bastante mais difícil desenvolver um produto que seja bem sucedido nestes parâmetros (Comissão Europeia, 2011).

4. Considerações Finais

Esta dissertação tinha por objetivo a identificação de métodos de preparação de gelatinas e pudins prontos a consumir, que permitissem estabelecer prazos de validade de 4 meses para as gelatinas e de 2 meses para os pudins. Este objetivo apenas foi alcançado com sucesso para a gelatina de morango da gama com açúcar preparada de acordo com o Método II. Com efeito, neste caso, durante os 4 meses de conservação, não se observaram alterações significativas ou a deterioração acentuada de nenhum dos parâmetros da qualidade analisados no presente estudo. O sabor amadurecido, pouco ácido e bastante doce mostrou-se adequado para estas amostras.

No caso da gelatina de tangerina da gama zero, apesar do Método II também ter garantido a sua inocuidade em termos microbiológicos, a aplicação de temperaturas muito elevadas (100 °C) durante um período de tempo mais alargado (condições do Método II) comprometeu a estabilidade dos parâmetros sensoriais e da cor ao longo do tempo de armazenamento. Com efeito, esta gelatina perdeu a sua acidez característica ao longo do tempo e tornou-se excessivamente doce e com sabor a fruto demasiado amadurecido. Desta forma, no caso desta gelatina sugere-se a utilização de condições mais suaves de temperatura (Método III), sendo necessário um maior controlo das condições de assepsia durante as operações de arrefecimento e embalagem, visto que ao fim de 9 semanas, apesar dos parâmetros sensoriais se terem mantido inalterados, surgiram problemas de contaminação com bolores. Outra forma de conseguir a validação do prazo de validade desta gelatina, poderá passar pela substituição dos corantes e aromas utilizados por outros, que permitam obter características organoléticas semelhantes, mas que apresentem maior estabilidade à temperatura, tornando viável a aplicação do Método II.

No caso do pudim de chocolate da gama zero, o Método II foi o que permitiu a sua conservação durante um maior período de tempo. Contudo, mesmo com este método mais severo, não se conseguiu assegurar a sua estabilidade microbiológica durante os dois meses pretendidos. As tentativas de alteração da formulação também não permitiram melhorar os resultados. Desta forma, seria interessante, para este produto recorrer a métodos que possibilitassem aumentar o seu tempo de prateleira, nomeadamente a introdução de conservantes ou, eventualmente, a avaliação de matérias-primas de outra origem, que permitam uma melhor estabilidade microbiológica e uma boa manutenção das características organoléticas finais do produto.

O lançamento de produtos alimentares prontos para consumo com a alegação “Isento de glúten” possibilita que pessoas que padeçam da doença celíaca ou que sofram de alguma intolerância ao glúten, possam identificar e escolher um regime alimentar o mais variado possível. Desta forma, ao garantir que este alergénio está ausente em todas as amostras produzidas no presente estudo, a sua replicação para o processamento industrial das sobremesas será uma mais valia para a empresa.

As provas de análise sensorial mostraram ser um fator fundamental na avaliação da aceitabilidade do produto ao longo do seu tempo de vida útil, sendo determinantes na estipulação do prazo de validade. A importância destas provas ficou bem patente no caso da validação da gelatina zero de tangerina preparada de acordo com o Método II.

Com a concretização do estudo de aceleração do tempo de vida útil foi possível antever as alterações a nível organolético e microbiológico das amostras em estudo e, desta forma, acelerar a validação dos resultados finais. Esta antevisão de resultados quando aplicada em contexto industrial irá possibilitar o desenvolvimento mais rápido e eficaz de novos produtos alimentares e consequentemente poupar recursos e tempo indispensáveis ao bom funcionamento da empresa.

As limitações do presente trabalho passaram pela impossibilidade de replicação da produção de amostras em larga escala e em contexto industrial, de forma a se poder validar os três métodos de preparação de amostras estudados. Ademais, o tipo de embalagem utilizada deveria ser o mais semelhante, se não igual, ao material de embalagem a ser utilizado nas sobremesas prontas produzidas em contexto industrial. Em estudos futuros seria uma mais valia a validação tanto dos modos de preparação em ambiente industrial, como das embalagens, de forma a se conseguir simular a produção em larga escala o mais próximo do contexto real, tendo em conta as boas práticas de higiene e segurança dos alimentos adequadas ao panorama de uma indústria alimentar. O constrangimento do tempo de estágio curricular foi igualmente uma limitação no presente estudo, uma vez que impossibilitou a verificação da estabilidade das amostras bem-sucedidas (gelatina com açúcar de morango) para além do tempo de vida útil predefinido como 4 meses.

5. Referências Bibliográficas

- Abbey, J., B. Fields, M. O'Mullane, & L. D. Tomaska. (2014). Food Additives: Colorants. *Encyclopedia of Food Safety*. (2):459–465p. ISBN 9780123786128.
- Aberoumand, Ali. (2012). Comparative Study between Different Methods of Collagen Extraction from Fish and Its Properties. *World Applied Sciences Journal* 16 (3): 316–19.
- Adami, S. F. (2016). *Alimentação e Nutrição Nos Ciclos Da Vida*. 1ed. Lajeado: Univates. [s.n.]. ISBN 978-85-8167-183-3.
- Adams, M. R. & Moss, M. (2008). *Food Microbiology*. 3rd ed. Guildford. The Royal Society of Chemistry. 63–118p. ISBN 9780854042845.
- Alamprese, C. & Manuela, M. 2011. Effects of Different Milk Substitutes on Pasting, Rheological and Textural Properties of Puddings. *LWT - Food Science and Technology* 44(10): 2019–25.
- Alija, J. & Talens, C. (2013). New Concept of Desserts with No Added Sugar. *International Journal of Gastronomy and Food Science* 1(2): 116–22.
- Ares, F., Arrarte, E., De León, T., Gastón, A., Gámbaro, A. (2012). Development of Functional Milk Desserts Enriched with Resistant Starch Based on Consumers' Perception. *Food Science and Technology International* 18(5): 465–75.
- Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H., & Davies, A (2011). The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. Report commissioned by the ILSI Europe emerging microbiological issues task force. ILSI Europe, Bruxelas, Bélgica, 62p.
- Benjakul, S & Phanat, K. (2018). Gelatin. *Encyclopedia of Food Chemistry*. 1. ed Phatthalung, Thailand: Elsevier Inc., 121-127p. ISBN 9780128140260.
- BIOKAR (2020a). Technical data sheet. Plate Count Agar. Disponível em http://www.solabia.com/Produto_248,9/BIOKAR-Diagnostics/PLATE-COUNT-AGAR-PCA.html, acessado em fevereiro de 2020.
- BIOKAR (2020b). Technical data sheet. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar. Disponível em http://www.solabia.com/Produto_282,9/BIOKAR-Diagnostics/DICHLORAN-ROSE-BENGAL-CHLORAMPHENICOL-DRBC-AGAR.html?lang=WW, acessado em fevereiro de 2020.
- BIOKAR (2020c). Technical data sheet. VBRG Agar. Disponível em http://www.solabia.com/Produto_160,9/BIOKAR-Diagnostics/VRBG-AGAR.html, acessado em fevereiro de 2020.
- Cocolin, L., Paola D., Valentina A., & Kalliopi, R. (2019). Microbiology of Fermented

- Dairy Products. *Encyclopedia of Microbiology*: 2. ed. Torino, Italy : Elsevier Inc., 74–185p. ISBN 9780128117378.
- Comissão Europeia. (2005). Regulamento N° 2073/2005 - Relativo a Critérios Microbiológicos Aplicáveis Aos Gêneros Alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* 338: 1–26.
- Comissão Europeia. (2001). Relatório Da Comissão Relativo à Ingestão de Aditivos Alimentares No Âmbito Do Regime Alimentar Na União Europeia. Disponível em <https://op.europa.eu/pt/publication-detail/-/publication/26105dba-6d8f-4515-a641-0e43fe3f5498/language-pt>, acedido em fevereiro de 2020
- Condalab (2020). Medio Glucosa OF ISO Cat. 2150 Para la identificación de enterobacterias. Disponível em https://www.condalab.com/int/en/dehydrated-culture-media/1345-5767-glucose-of-medium-iso.html#/2-formato-500_g, acedido em fevereiro de 2020.
- Cruz, R., Rico, B., & Vieira, M. (2019). Food Quality and Shelf Life *Food Packaging and Migration*. Elsevier Inc. Disponível em <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00009-4>, acedido em janeiro de 2020
- Curia, A. V., Hough, G., Martínez, M. C., & Margalef, M. I. (2001). *How Argentine consumers understand the Spanish translation of the 9-point hedonic scale. Food Quality and Preference*, 12(3), 217–221.
- Demartini, M., Pinna, C., Terzi, S., & Sansone, C. (2018). Food Industry Digitalization: From Challenges and Trends to Opportunities and Solutions. *IFAC-PapersOnLine* 51(11): 1371–78.
- Dias, C., Borges, S., Queiroz, F., & Pimenta, P. (2011). Influência Da Temperatura Sobre as Alterações Físicas, Físico-Químicas e Químicas de Geleia Da Casca de Banana (Musa Spp.) Cv. Prata Durante o Armazenamento. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 70(1): 28–34.
- European Parliament & Council. (2011). Commission Regulation (EU) N° 1129/2011 of 11 November 2011 Amending Annex II to Regulation (EC) N° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by Establishing a Union List of Food Additives. *Official Journal of the European Union* L295: 1–177.
- FAO. (2016). Traditional microbiological quality control. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/003/T1768E/T1768E04.htm>, acedido em fevereiro de 2020.
- FDA. (2003). Guidance for Industry: Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. *SubStance* (Revision 2): 1–22.
- Figiel, A., Wojdylo, A., & Oszmianski, J. (2017). Effect of Drying Methods with the

- Application of Vacuum Microwaves on the Bioactive Compounds, Color, and Antioxidant Activity of Strawberry Fruits. *International Journal of Molecular Sciences* 141(4): 1337–43.
- Fiorucci, A., Soares, M., & Cavaleiro, E. (2002). Ácidos Orgânicos: Dos Primórdios Da Química Experimental à Sua Presença Em Nosso Cotidiano. *Química Nova Na Escola* 31(15): 55–58.
- Guerra, A. (2016). Microbiologia de Alimentos - Métodos de Contagem Microbiana. 1-28p. Disponível em <http://files.microbiologia-de-alimentos.webnode.com>, acedido em outubro de 2019
- Giménez, P. J., Fernández-López, J. A., Angosto, J. M., & Obón, J. M. (2015). Comparative thermal degradation patterns of natural yellow colorants used in foods. *Plant foods for human nutrition*, 70(4), 380-387.
- Goswami, A. J., & Shah, N. J., (2013). Artificial Preservatives and Their Harmful Effects: Looking toward Nature for Safer Alternatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research* 4 (7): 1220–28.
- Harrigan, W.F., & Mccance, M. E. (1966). Cultivation of Micro-Organisms. *Laboratory Methods in Microbiology*: 1. ed. London : Academic Press Inc, 14-16p. ISBN 6629494.
- Hough, G. (2010). Sensory Shelf Life Estimation of Food Products *Sensory Shelf Life Estimation of Food Products*. Boca Raton, USA : CRC Press. ISBN 9781420092943.
- Hough, Guillermo, K. Langohr, G. Gómez, & A. Curia. (2003). Survival Analysis Applied to Sensory Shelf Life of Foods. *Journal of Food Science* 68(1): 359–62.
- Húngaro, H., Peña, W. E.L., Silva, N. B.M., Carvalho, R. V., Alvarenga, V. O., & Sant'Ana, A. S. (2014). Food Microbiology. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* 3: 213–31.
- ISO 1741. (2001). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs- Horizontal Method for the Enumeration of Psychrotrophic Microorganisms. : 1–13.
- ISO 21528-2. (2004). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs- Horizontal Method for the Detection and Enumeration of Enterobacteriaceae. : 1–11.
- ISO 21527-1. (2008). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs- Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds. : 1–8.
- ISO 4833-1. 2013. Microbiology of the Food Chain - Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms. : 1–9.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., & Golden, D.A. (2005). Modern Food Microbiology. Springer Science & Business Media. New York, EUA, 790p. ISBN 0-387-23180-3.

- Kamal, T., Song, Y., Zhang, T., Zhu, B. W., Tan, M. (2018). Effect of Hydrocolloid and Processing Potentiality on Water Migration in Apple Jellies of Yinduqing Cultivar. *Lwt* 98: 381–89.
- Li, J. M. & Nie, S. P. (2016). The Functional and Nutritional Aspects of Hydrocolloids in Foods. *Food Hydrocolloids* 53: 46–61.
- Liao, H., Wenxian, Z., Zhong, K. & Liu, Y. (2020). *Evaluation of Colour Stability of Clear Red Pitaya Juice Treated by Thermosonication*. Food Science and Technology International. Elsevier Ltd.121: 2-35.
- Lidon, F., & Silvestre, M. M. (2007). Aditivos Alimentares. *Indústrias Alimentares - Aditivos e Tecnologia*, 360p. Disponível em <https://www.golder.com/insights/block-caving-a-viable-alternative/%0A???>, acessado em março de 2020
- Liu, Y. X., Cao, M., & Liu, G. (2019). Evaluation Technologies for Food Quality *Texture Analyzers for Food Quality Evaluation*. Elsevier Inc, 441–463p. ISBN 9780128142172.
- Lopes, T., Xavier, M., Quadri, M. & Quadri, M. (2007). Antocianinas: Uma Breve Revisão Das Características Estruturais e Da Estabilidade. *Revista brasileira de agrociencia* 13(3): 291–97.
- Louarme, L. & Billaud, C. (2012). Evaluation of Ascorbic Acid and Sugar Degradation Products during Fruit Dessert Processing under Conventional or Ohmic Heating Treatment. *LWT - Food Science and Technology* 49(2): 184–87.
- Loypimai, P., Moongngarm, A., & Chottanom, P. (2016). Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. *Journal of food science and technology*, 53(1), 461-470.
- Madrid V. A., Cenzano, J. & Vicente, J. (1994). *Nuevo Manual de Industrias Alimentarias*. ampliada ed. Madrid : Iragra, S.A. ISBN 9788578110796.
- MFPI. (2016). Guidance Document How to Determine the Shelf Life of Food. *Ministry for Primary Industries* (June): 1–42p. Disponível em <http://www.foodsafety.govt.nz/industry/general/labelling-composition/>, acessado em janeiro de 2020
- Milani, J. & Maleki, G. (2012). Hydrocolloids in Food Industry. *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*. Disponível em https://www.researchgate.net/publication/221925367_Hydrocolloids_in_Food_Industry, acessado em dezembro de 2019
- Mizrahi, S. (2011). Food and Beverage Stability and Shelf Life *Accelerated Shelf Life Testing of Foods*. Elsevier Inc, 482-506p. ISBN 9781845697013
- Molecular Devices. (2020). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Disponível em <https://www.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent> -

- assay-elisa, acedido em fevereiro de 2020.
- Moschopoulou, E., Moatsou, G., Syrokou, M.K., Paramithiotis, S. Drosinos, E.H.. (2019). *Food Quality and Shelf Life Food Quality Changes during Shelf Life*. Elsevier Inc, 1-31p. ISBN 9780128171905.
- Muir, D.D. (2011). *Food and Beverage Stability and Shelf Life The Stability and Shelf Life of Milk and Milk Products*. Woodhead Publishing Limited. ISBN 9781855735002.
- Neogen Corporation. (2010). *Água Peptonada – Peptone Water (7365)*.Disponível em https://proficiency.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7365_pt_pi.pdf. Acedido em novembro de 2019
- Oliveira, S. W., Neves, A. D. & Ballus, A. C. (2019). *Evaluation Technologies for Food Quality Mature Chemical Analysis Methods for Food Chemical Properties Evaluation*. Elsevier Inc. 63-90p. ISBN 9780128142172.
- Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia. (2014). *Jornal Oficial da União Europeia Regulamento de Execução (UE) N.º 828/2014 Da Comissão de 30 de Julho de 2014*: 18–63.
- Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia. (2011). *Regulamento (UE) N.º 1169/2011 Do Parlamento Europeu e Do Conselho de 25 de Outubro de 2011. Jornal Oficial da União Europeia 2011*: 18–63.
- Patras, Antoanela. (2019). *Stability and Colour Evaluation of Red Cabbage Waste Hydroethanolic Extract in Presence of Different Food Additives or Ingredients. Food Chemistry 275*: 539–48.
- Poppe, J. (1997). *Gelatin. Thickening and Gelling Agents for Food*, 168. [S.l.] : Chapman & Hall,145–168p. ISBN 9781461521976.
- Putnik, P., Bursać, K. D., Herceg, K., Roohinejad, S., Greiner, R., Bekhit, A. Levaj, B. (2017). *Modelling the Shelf-Life of Minimally-Processed Fresh-Cut Apples Packaged in a Modified Atmosphere Using Food Quality Parameters. Food Control 81*: 55–64.
- Sancho-Madriz, M. F. (2003) *Preservation of food products*. [S.l.] : Elsevier Science Ltd, 4766–4772p. ISBN 2550268.
- Santos, M. I., Correia, C., Cunha, M. I., Saraiva, M. M. Novais, M. R. (2005). *Valores Guia Para a Avaliação de Alimentos Cozinhados Prontos a Comer. Revista da Ordem dos Farmacêuticos 64*: 66–68.
- Saraiva, M., Correi, C., Cunha, I., Maia, C; Bonito, C; Furtado, R; Calhau, M. (2019). *Interpretação de Resultados de Ensaios Microbiológicos Em Alimentos Prontos Para Consumo e Em Superfícies Do Ambiente de Preparação e Distribuição Alimentar. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*: 42p.
- Saunders, A. B. (2016). *Dairy desserts. Reference Module in Food Science*. Palmerston North, New Zealand : Elsevier Inc, 1-8p. ISBN 9780081005965v.

- Siracusa, V., & Lotti, N. (2019). Food Quality and Shelf Life *Intelligent Packaging to Improve Shelf Life*. Elsevier Inc. 261-279p. ISBN 9780128171905.
- Souza, C. S. (2017). Efeito da Substituição Parcial de Manteiga de Cacau por Gordura CBE no Perfil de Compostos Voláteis de Chocolate Meio Amargo. *Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil*
- Stone, H., Bleibaum, R. N. & Heather, A. T. (2012). Introduction to Sensory Evaluation. *Sensory Evaluation Practices*: 1–21p. ISBN 9780123820860.
- Techer, C., Jan, S., Thierry, A., Maillard, M. B., Grosset, N., Galet, O., Breton, V., Gautier, M. & Baron, F. (2019). Identification of the Bacteria and Their Metabolic Activities Associated with the Microbial Spoilage of Custard Cream Desserts. *Food Microbiology* 86: 103317.
- Torbica, A., Belović, M., Mastilović, J., Kevrešan, Ž., Pestorić, M., Škrobot, D. & Dapčević H. T. (2016). Nutritional, Rheological, and Sensory Evaluation of Tomato Ketchup with Increased Content of Natural Fibres Made from Fresh Tomato Pomace. *Food and Bioproducts Processing* 98: 299–309.
- Vareltzis, P., Adamopoulos, K., Stavrakakis, E., Stefanakis, A., & Goula, A. M. (2016). Approaches to minimise yoghurt syneresis in simulated tzatziki sauce preparation. *International Journal of Dairy Technology*, 69(2), 191-199.
- Xu, L. Chen, P., Liu, T., Ren, D., Dong, N., Cui, W., He, P., Bi, Y., Lv, N., Ntakatsane, M. (2020). A Novel Sensitive Visual Count Card for Detection of Hygiene Bio-Indicator—Molds and Yeasts in Contaminated Food. *Lwt* 117(September 2019): 108687.
- Wibowo, S., Grauwet, T., Santiago, J. S., Tomic, J., Vervoort, L., Hendrickx, M. & Van, L. A. (2015). Quality Changes of Pasteurised Orange Juice during Storage: A Kinetic Study of Specific Parameters and Their Relation to Colour Instability.” *Food Chemistry* 187: 140–51.
- Wood, R., Foster, L., Damant, L. & Key, P. (2004). *Analytical Methods for Food Additives*. First. Woodhead, 274p. ISBN 084932534.
- Young, N.W.G., & O’Sullivan, G. R. (2011). Food and Beverage Stability and Shelf Life *The Influence of Ingredients on Product Stability and Shelf Life*. Woodhead Publishing Limited.:132-183. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1533/9780857092540.1.132>, acedido em fevereiro de 2020

Anexo I

Exemplo do Questionário de Avaliação Sensorial

Questionário Avaliação Sensorial	Página: 01 de 01
	Revisão: 01

Nome: _____

Data: _____

Sexo: M F **Idade:** _____

Procedimento: Receberá uma amostra. Recorrendo aos números de 1-5 classifique-a.

1-não gostei nada; 2-Gostei pouco; 3-Indiferente; 4-Gostei; 5-Gostei muito

Pudim Zero Flan						
Amostra	Aspecto	Cor	Textura	Sabor	Doçura	Classificação Geral
A						

Pudim Zero Chocolate						
Amostra	Aspecto	Cor	Textura	Sabor	Doçura	Classificação Geral
B						

Gelatina Zero Tangerina							
Amostra	Aspecto	Cor	Consistência	Sabor	Doçura	Acidez	Classificação Geral
C							

Gelatina Zero Amora							
Amostra	Aspecto	Cor	Consistência	Sabor	Doçura	Acidez	Classificação Geral
D							

Gelatina c/açúcar Maracujá							
Amostra	Aspecto	Cor	Consistência	Sabor	Doçura	Acidez	Classificação Geral
E							

Gelatina c/açúcar Ananás							
Amostra	Aspecto	Cor	Consistência	Sabor	Doçura	Acidez	Classificação Geral
F							

Elaborado:
Catarina Almeida
_____/_____/_____