



João Afonso Hungria Magalhães Marques Alves
Licenciado em Bioquímica

**Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e sensorial
de sobremesas lácteas prontas a consumir
ao longo do tempo de armazenamento**

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

Orientadora: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

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

Júri:

Presidente: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão

Arguente: Professora Doutora Elisabete Muchagato Maurício

Vogal: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



Novembro 2020



João Afonso Hungria Magalhães Marques Alves
Licenciado em Bioquímica

**Avaliação da qualidade microbiológica, físico-
química e sensorial
de sobremesas lácteas prontas a consumir
ao longo do tempo de armazenamento**

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

Orientadora: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho
Duarte, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

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

Júri:

Presidente: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão

Arguente: Professora Doutora Elisabete Muchagato Maurício

Vogal: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



Novembro 2020

“Avaliação microbiológica, físico-química e sensorial de sobremesas lácteas prontas a consumir ao longo do tempo de armazenamento”

Copyright ©João Afonso Hungria Magalhães Marques Alves, FCT-UNL.

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.

«Coloquei a minha genialidade na minha vida.
E no meu trabalho coloquei apenas o talento.»

By **Oscar Wilde**

Agradecimentos

A vida é feita de momentos que nos fazem crescer e tornar-nos pessoas melhores. Ao longo da trajetória académica deparamo-nos com dificuldades, muitas delas difíceis de ultrapassar. Mas, com a ajuda de todos tornamo-nos mais confiantes e conseguimos atingir os nossos objetivos. Concluo mais um capítulo da minha vida académica, o mestrado. Não podia ter escolhido melhor o curso e as pessoas que me ajudaram. E são essas as pessoas cujo nome aqui deixo em letra de forma.

Primeiro, um agradecimento muito especial à Professora Doutora **Maria Paula Duarte**, por todos os ensinamentos que me proporcionou durante o Mestrado e por me ter aceite como seu orientando. Quero igualmente agradecer-lhe por me ter acompanhado nesta aventura e me ter tirado todas as dúvidas ao longo da realização da dissertação.

Segundo, outro especial agradecimento à Engenheira **Carla Almeida**, que me acolheu nas instalações da Condi Alimentar, S.A. e que também me acompanhou de perto ao longo deste percurso.

Terceiro, aos colaboradores da Engenheira **Carla Almeida**, que trabalham dias a fio para desenvolver novos produtos para serem lançados no mercado com o objetivo de pôr a marca Condi nas bocas do Mundo: à **Ângela Baptista**, **Zulmira Neixa**, **Ana Branco** e **Catarina Almeida**, por todo o carinho e apoio que me prestaram aquando da minha permanência na empresa.

Quarto, quero agradecer igualmente às e aos professores do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa: **Ana Lúcia Leitão**, **Ana Luísa Fernando**, **Benilde Mendes**, **Margarida Gonçalves**, **Nuno Lapa** e à secretária **D. Lurdes** por me terem transmitido os conhecimentos e ensinamentos indispensáveis que me ajudaram a concretizar este objetivo.

Quinto, aos amigos de coração que me acompanharam durante esta jornada: à **Sofia Mourão**, pelas conversas profundas que tivemos ao longo de todo o trabalho; à **Raquel Palma**, que me ajudou sempre na área da Microbiologia, e, por último, à **Vanessa Francisco**, que tem sempre os pés bem assentes na terra e me abriu os olhos nos momentos em que julguei que não conseguia ultrapassar os obstáculos. Uma referência também a outros amigos que me ajudam sempre que preciso: aos meus queridos **Hidrolisados**, aos meus colegas da **Escola de Atores – ACT**, principalmente à **Mariana Carreira**, à minha madrinha de praxe **Rosa Nascimento**, à minha melhor amiga do teatro **Sara Barreiros** e aos meus colegas do Mestrado de Tecnologia e Segurança Alimentar, por todos os momentos que partilhámos.

The last, but not the least, à minha **MARAVILHOSA** família, que tem apoiado sempre as minhas escolhas e me tem feito muito feliz. À minha mãe (**Paula Magalhães**) e ao meu pai (**Paulo Alves**), por me apoiarem incondicionalmente e por serem o meu porto de abrigo sempre que preciso; à minha avó (**Conceição Magalhães**), por ser uma pessoa com quem posso conversar sobre tudo ao chegar a casa: à minha tia (**Helena Magalhães**) que sempre me ajudou durante o decurso do Mestrado; aos meus tios (**Fernando Magalhães** e **Paula Magalhães**) bem como às minhas “irmãs emprestadas” (**Francisca Magalhães** e **Carolina Magalhães**), pelo seu apoio, e à **Virgínia Baptista**, por me transmitir sempre os seus conhecimentos e sabedoria.

A todos o meu **MUITO OBRIGADO!!!**

Resumo

Atualmente, os consumidores procuram alimentos com melhor qualidade, pelo que essa expectativa deve manter-se desde o período de compra até ao momento do consumo. A validação do tempo de vida útil de novos produtos é muito importante, de forma a perceber se eles são seguros, se conseguem preservar as características químicas, microbiológicas e sensoriais e se sustentam o seu valor nutricional conforme o descrito no rótulo, ao longo do tempo. O crescimento microbiano é fator-chave para se estudar o tempo de vida útil de um determinado alimento perecível. No entanto, avaliando só este parâmetro não é possível garantir a qualidade e a segurança desse produto alimentar, sendo necessário realizar, também, avaliações sensoriais e físico-químicas.

Este trabalho pretendeu caracterizar, ao nível das propriedades microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, quatro sobremesas prontas para consumo – produtos novos da marca Condi Alimentar S.A. (Pudim Zero Flan, Pudim Zero Chocolate, Cremoso Nata-Caramelo e Cremoso Chocolate) – ao longo do seu prazo de validade, que neste caso foi de três meses (noventa dias). As sobremesas foram realizadas a nível industrial e identificadas de acordo com a fase de produção, como INÍCIO, MEIO e FIM e, de seguida, foram armazenadas a uma temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em frigoríficos. Assim, o trabalho consistiu em: 1) apurar a qualidade microbiológica, fazendo a pesquisa/contagem de microrganismos totais a 30°C , psicrófilos, leveduras, bolores e *Enterobacteriaceae* a 37°C . O grau de conformidade foi obtido por comparação com os Valores-Guia do subgrupo 1A estipulados pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge; 2) estudar as propriedades físico-químicas das sobremesas, através da medição de pH e da cor; 3) avaliar a aceitação dos novos produtos pelos consumidores em termos de doçura, aspeto, textura, cor e sabor, por meio de provas sensoriais hedónicas (testes de aceitação/preferência).

O trabalho desenvolvido permitiu identificar a ausência de manutenção da higiene do processo ao longo de toda a produção, com diferenças na contaminação microbiológica dos produtos recolhidos nas diferentes fases de processamento (INÍCIO, MEIO e FIM). Para além disto, algumas formulações, especialmente o Pudim Zero Chocolate, o Cremoso Nata-Caramelo e o Pudim Zero Flan (MEIO), apresentaram análises não satisfatórias ao fim de poucos dias de armazenamento. Assim, o trabalho realizado evidenciou a necessidade de se proceder a reformulações destas sobremesas e mudar alguns parâmetros no modo de processamento.

Palavras-Chave: Pudins; Cremosos; Avaliação Microbiológica; Avaliação Sensorial; Avaliação Físico-Química

Abstract

Currently, consumers seek to buy food with better quality, so this expectation should be maintained from the period of purchase until the moment of consumption. The validation of the lifespan of new products is very important, in order to perceive if they are safe, if they can preserve the chemical, microbiological and sensorial characteristics and if they sustain their nutritional value as described on the label, along the time. Microbial growth is a key factor in studying the shelf life of a given perishable food. However, only evaluating this parameter is not possible to guarantee the quality and safety of this food product, and it is also necessary to perform sensory and physical-chemical evaluations.

This work, intended to characterize, in terms of microbiological, physicochemical and sensorial properties, four ready to consume desserts - new products of Condi Alimentar S.A. brand (Zero Flan Pudding, Zero Chocolate Pudding, Creamy Cream-Caramel and Creamy Chocolate) - along its shelf life, which is three months in these cases (ninety days). The desserts were made at an industrial level and identified according to the production phase, such START, MIDDLE and END and then stored at a temperature of $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, in refrigerators. Thus, the work consisted of: 1) ascertaining the microbiological quality, performing microbial research/counting analyses of total microorganisms at 30°C , psychrotrophic, yeasts, moulds and *Enterobacteriaceae* at 37°C . The degree of compliance was established by comparison with the Guide Values of subgroup 1A stipulated by the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge; 2) study physical-defined properties of desserts, through the measurement of pH and color; 3) evaluate the acceptance of new products by consumers in terms of sweetness, appearance, texture, color and taste, through hedonic sensory tests (acceptance/preference tests).

The work developed allowed the identification of the lack of maintenance of the process hygiene throughout the production, with differences in the microbiological contamination of the products collected in the different processing stages (START, MIDDLE and END). In addition to this, some formulations, especially, Zero Chocolate Pudding, Creamy Cream-Caramel and Zero Flan Pudding (MIDDLE), have revealed unsatisfactory analyzes after a few days of storage. Thus, the work carried out showed the need to reformulate these desserts and change some parameters in the processing mode.

Keywords: Puddings; Creamy; Microbiological evaluation; Physico-chemical evaluation; Sensory evaluation

Lista de Abreviaturas/Sigla

> - Maior que

< - Menor que

ΔE – Variação Total de Cor

$^{\circ}C$ – Graus Centígrados

a^* - Coordenada Verde (- a^*)/Vermelho (- a^*)

a_w – Atividade da Água

b^* - Coordenada Azul (- b^*)/Amarelo (- b^*)

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

BAL – Bactérias Ácido-Láticas

DRBC – *Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol Agar* (Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol)

CAP – *Controlled Atmosphere Packaging* (Embalagem em atmosfera controlada)

CAS – *Controlled Atmosphere Storage* (Armazenagem em atmosfera controlada)

CE – Comissão Europeia

CO₂ – Dióxido de Carbono

CT – Connecticut

CYA – *Czapek Yeast Agar*

DDA – Doses Diárias Admissíveis

E_h – Potencial de Oxidação-Redução

EUA – Estados Unidos da América

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

FCT-UNL – Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa

FDA – *Food and Drug Administration*

FSAI - *Food Safety Authority of Ireland* (Autoridade de Segurança Alimentar da Irlanda)

HDPE – Polietileno de Alta Densidade

I&D – Investigação e Desenvolvimento

IFS Food – *International Featured Standard Food* (Normas Internacionais de Alimentação em Destaque)

IFST – *Institute of Food Science and Technology* (Instituto de Ciência e Tecnologia Alimentar)

ILSI Europe – *International Life Sciences Institute Europe* (Instituto Internacional de Ciências da Vida da Europa)

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

ISO – *International Organisation for Standardization* (Organização Internacional de Normalização)

L* - Luminosidade

LDPE – Polietileno de Baixa Densidade

Log - Logaritmo

MA - Massachusetts

MAP – *Modified Atmosphere Packaging* (Embalagem em atmosfera modificada)

mV - Milivolts

N₂ - Azoto

NMP – Número Mais Provável

NY – *New York* (Nova Iorque)

NZFSA - *New Zealand Food Safety Authority* (Autoridade de Segurança Alimentar da Nova Zelândia)

O₃ – Ozono

O₂ - Oxigénio

PA – Pensilvânia

PC – Policarbonato

PCA – *Plate Count Agar*

PET – Politereftalato de Etileno

pH – Potencial Hidrogeniónico

PP – Polipropileno

PS – Poliestireno

PVDC – Policloreto de Vinilideno

RH – Relative Humidity (Humidade Relativa)

S.A. – Sociedade Anónima

SGS – *Société Générale de Surveillance* (Sociedade Geral de Vigilância)

TPA – *Texture Profile Analysis* (Análise do Perfil de Textura)

TTIs – *Time Temperature Indicators* (Indicadores de Temperatura Temporal)

UE – União Europeia

UFC– Unidades formadoras de colónias

UK – *United Kingdom* (Reino Unido)

VMA – Valor Máximo Admissível

VMR – Valor Máximo de Referência

VRBG – *Violet Red Bile Glucose Agar* (Agar Bile Vermelho Violeta Glucose)

Índices

• Índice de Conteúdos

1) Introdução Teórica.....	1
1.1) Caraterização da Empresa Condi Alimentar, S.A.....	1
1.2) Estudo de Vida Útil de Produtos Alimentares.....	1
1.2.1) Fatores intrínsecos que influenciam a “Vida Útil de um Alimento”.....	3
1.2.1.1) Ingredientes.....	3
1.2.1.2) Atividade da Água (a_w).....	4
1.2.1.3) Acidez do Alimento (pH).....	6
1.2.1.4) Potencial Oxidação-Redução (E_h).....	7
1.2.1.5) Composição Química dos Alimentos.....	8
1.2.1.6) Estrutura Biológica do Alimento.....	9
1.2.1.7) Constituintes Naturais com Atividade Antimicrobiana.....	10
1.2.1.8) Atividade Enzimática.....	11
1.2.2) Fatores Extrínsecos.....	11
1.2.2.1) Temperatura.....	11
1.2.2.2) Humidade Relativa (HR).....	12
1.2.2.3) Composição atmosférica envolvente.....	13
1.2.2.4) Processamento nos alimentos.....	15
1.2.2.5) Questões Logísticas e de Retalho.....	16
1.2.2.6) Embalamento.....	16
1.2.3) Estudos de Vida Útil num Alimento.....	18
1.2.3.1) Método Direto.....	18
1.2.3.2) Métodos Indiretos.....	21
1.2.4) Indicadores de Avaliação da Vida Útil de um Alimento.....	23
1.2.4.1) Análise Sensorial.....	23
1.2.4.2) Avaliação Físico-Química.....	25
1.2.4.3) Avaliação Microbiológica.....	27
1.3) Aditivos.....	29
1.4) Sobremesas Lácteas.....	29
1.4.1) Pudins & Cremosos.....	30
1.4.2) Ingredientes Comuns na Formulação de Sobremesas Lácteas.....	30

1.4.2.1) Água.....	31
1.4.2.2) Leite em Pó.....	31
1.4.2.3) Amido.....	32
1.4.2.4) Sal.....	32
1.4.2.5) Chocolate, Chocolate Branco & Cacau.....	32
1.4.2.6) Açúcar.....	33
1.4.2.7) Nata.....	33
1.4.2.8) Farinha de Aveia.....	34
1.4.2.9) Hidrocolóides – Carragenina/Carragenano.....	34
1.4.2.10) Goma de farinha de alfarroba.....	35
1.4.2.11) Goma Xantana.....	36
1.4.2.12) Aromas/Aromatizantes.....	36
1.4.2.13) Corantes.....	37
1.4.2.14) Edulcorantes.....	38
2) Objetivos.....	40
3) Materiais e Métodos.....	41
3.1) Equipamentos e meios de cultura.....	41
3.2) Constituição de cada Sobremesa Láctea em estudo.....	41
3.3) Produção e Recolha das Amostras.....	41
3.4) Avaliação Microbiológica.....	42
3.4.1) Preparação de soluções e meios de cultura.....	42
3.4.1.1) Solução de Triptona-Sal.....	42
3.4.1.2) Meio <i>Plate Count Agar</i> (PCA).....	43
3.4.1.3) Meio <i>Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol Agar</i> (DRBC).....	43
3.4.1.4) Meio <i>Violet Red Bile Glucose Agar</i> (VRBG).....	44
3.4.2) Métodos diretos de Pesquisa e de Contagem Microbiana.....	45
3.4.2.1) Preparação das Amostras.....	45
3.4.2.2) Método Horizontal de Enumeração de Microrganismos Aeróbios Totais a 30°C, segundo a norma ISO 4833-1:2013.....	46
3.4.2.3) Método Horizontal de Enumeração de Microrganismos Psicrotróficos, segundo a norma ISO 17410:2019.....	46
3.4.2.4) Método Horizontal de Enumeração de <i>Enterobacteriaceae</i> , segundo a norma ISO 21528-2:2017.....	47
3.4.2.5) Método Horizontal de Enumeração de Bolores e Leveduras, segundo a norma ISO 21527-1:2008.....	48
3.5) Avaliação Físico-Química.....	48
3.5.1) Determinação do pH.....	48

3.5.2) Determinação da Cor.....	49
3.6) Avaliação Sensorial.....	49
3.7) Análise Estatística.....	50
4) Resultados e Discussão.....	51
4.1) Avaliação Microbiológica.....	51
4.1.1) Pudim Zero Flan & Pudim Zero Chocolate.....	52
4.1.2) Cremoso Chocolate & Cremoso Nata-Caramelo.....	57
4.2) Avaliação Físico-Química.....	60
4.2.1) pH.....	60
4.2.1.1) Pudim Zero Flan & Pudim Zero Chocolate.....	60
4.2.1.2) Cremoso Chocolate & Cremoso Nata-Caramelo.....	61
4.2.2) Cor.....	62
4.2.2.1) Pudim Zero Flan & Pudim Zero Chocolate.....	62
4.2.2.2) Cremoso Chocolate & Cremoso Nata-Caramelo.....	64
4.3) Avaliação Sensorial.....	65
4.3.1) Pudim Zero Flan & Pudim Zero Chocolate.....	65
4.3.2) Cremoso Chocolate.....	67
5) Conclusão.....	68
6) Referências Bibliográficas.....	69
ANEXO I.....	84
ANEXO II.....	85
ANEXO III.....	86

• Índice de Figuras

Figura 1.1: Logótipo da empresa Condi Alimentar, S.A.....	1
Figura 1.2: Estrutura química dos diferentes compostos fenólicos.....	10
Figura 1.3: Dinâmica da atmosfera dentro de uma embalagem em atmosfera modificada.....	14
Figura 1.4: Imagem do <i>software</i> informático “ComBase Predictor”.....	22
Figura 1.5: Os cinco sabores básicos detetados pelas papilas gustativas.....	24
Figura 1.6: Sistema de cor L^* , a^* e b^* tridimensional e a duas dimensões com luminosidade fixa.....	26
Figura 1.7: Sistema de cor a^* e b^* , Ângulo de Hue e Chroma (C^*) com luminosidade fixa.....	27
Figura 1.8: Estruturas químicas das carrageninas: k , i , λ , θ , ν e μ	35
Figura 1.9: Estrutura química da goma xantana com as cadeias laterais alinhadas com a espinha dorsal.....	36
Figura 1.10: Fórmula Química do corante Betacaroteno.....	37
Figura 1.11: Fórmula Química do corante Curcumina.....	38
Figura 1.12: Fórmula Química do Acessulfame-K.....	39
Figura 3.1: Embalagens PS utilizadas para embalar as amostras.....	42
Figura 3.2: Processo de preparação das diluições seriadas de 10^{-1} , até à diluição 10^{-5}	46
Figura 4.1: Aspeto das placas de microrganismos totais a 30°C obtidas com as amostras de Pudim Zero Flan.....	53
Figura 4.2: Aspeto das placas de microrganismos totais a 30°C obtidas com as amostras de Cremoso Nata-Caramelo.....	58
Figura AIII.1: Aparência das amostras INÍCIO (A), MEIO (B) e FIM (C) do Pudim Zero Flan.....	87
Figura AIII.2: Aparência das amostras INÍCIO (A), MEIO (B) e FIM (C) do Pudim Zero Chocolate.....	87
Figura AIII.3: Aparência das amostras INÍCIO (A), MEIO (B) e FIM (C) do Cremoso Chocolate.....	88
Figura AIII.4: Aparência das amostras INÍCIO (A), MEIO (B) e FIM (C) do Cremoso Nata-Caramelo.....	88

• Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Mudanças microbiológicas, físicas, químicas e induzidas pela luz que ocorrem durante o tempo de vida útil de um alimento.....	3
Tabela 1.2A: Valores mínimos, ótimos e máximos de atividade da água (a_w) para o crescimento de algumas bactérias patogênicas que se desenvolvem nos alimentos.....	5
Tabela 1.2B: Valores mínimos aproximados de atividade da água (a_w) que promovem o crescimento de alguns fungos e leveduras nos alimentos.....	6
Tabela 1.3: Valores mínimos, ótimos e máximos de pH para desenvolvimento de algumas bactérias patogênicas.....	7
Tabela 1.4: Classificação dos microrganismos quanto ao seu potencial <i>redox</i> e tolerância ao oxigênio e exemplos de bactérias para cada classificação.....	8
Tabela 1.5: Gama de temperaturas de crescimento para cada grupo de microrganismos.....	12
Tabela 1.6: Valores mínimos, ótimos e máximos de temperatura (°C) para desenvolvimento de algumas bactérias patogênicas.....	12
Tabela 1.7: Etapas do Método Direto para determinar o tempo de prateleira de um alimento.....	19
Tabela 3.1: Descrição das provas sensoriais realizadas, em dias diferentes, durante o tempo de armazenamento das sobremesas instantâneas em estudo.....	50
Tabela 4.1: Valores-Guia, respeitante aos microrganismos indicadores de higiene e de alteração utilizados para avaliação microbiológica da qualidade de alimentos prontos para consumo não manuseados após o tratamento térmico (subgrupo 1A).....	52
Tabela 4.2: Resultados dos ensaios microbiológicos feitos ao Pudim Zero Flan nas diversas fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM).....	52
Tabela 4.3: Resultados dos ensaios microbiológicos feitos ao Pudim Zero Chocolate nas diversas fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM).....	53
Tabela 4.4: Resultados dos ensaios microbiológicos feitos ao Cremoso Chocolate nas diversas fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM).....	57
Tabela 4.5: Resultados dos ensaios microbiológicos feitos ao Cremoso Nata-Caramelo nas diversas fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM).....	58
Tabela 4.6: Valores de pH ao longo do tempo de armazenamento para os Pudins Zero Flan e Zero Chocolate nas diversas fases de produção.....	60
Tabela 4.7: Valores de pH ao longo do tempo de armazenamento para o Cremoso Chocolate e Cremoso Nata-Caramelo, nas diversas fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM).....	61
Tabela 4.8: Variação dos parâmetros da cor L^* , a^* , b^* , ΔE , Ângulo de Hue e Chorma (C^*) do Pudim Zero Flan, ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM.....	62

Tabela 4.9: Variação dos parâmetros da cor L^* , a^* , b^* , ΔE , Ângulo de Hue e Chroma (C^*) do Pudim Zero Chocolate, ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM.....	62
Tabela 4.10: Variação dos parâmetros da cor L^* , a^* , b^* , ΔE , Ângulo de Hue e Chroma (C^*) do Cremoso Chocolate, ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM.....	64
Tabela 4.11: Variação dos parâmetros da cor L^* , a^* , b^* , ΔE , Ângulo de Hue e Chroma (C^*) do Cremoso Nata-Caramelo, ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM.....	64
Tabela 4.12: Avaliação dos parâmetros sensoriais (Aspetto, Cor, Textura, Sabor, Doçura e, no final, uma Classificação Geral), ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO e FIM do Pudim Zero Flan.....	66
Tabela 4.13: Avaliação dos parâmetros sensoriais (Aspetto, Cor, Textura, Sabor, Doçura e, no final, uma Classificação Geral), ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM do Pudim Zero Chocolate.....	66
Tabela 4.14: Avaliação dos parâmetros sensoriais (Aspetto, Cor, Textura, Sabor, Doçura e, no final, uma Classificação Geral), ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM do Cremoso Chocolate.....	68
Tabela AI.1: Quadro com os reagentes utilizados durante a atividade prática e a sua respectiva referência e marca.....	85
Tabela AI.2: Quadro com o material utilizado durante a atividade prática e o seu respetivo modelo e marca.....	85

1) Introdução Teórica

1.1) Caracterização da Empresa Condi Alimentar, S.A.

A Condi Alimentar, S.A. (*figura 1.1*) é uma empresa portuguesa de cariz familiar fundada em 1991. Nela trabalham mais de 100 pessoas distribuídas por diversas áreas, incluindo a de Investigação e Desenvolvimento, equipa constituída por técnicos portugueses.



Figura 1.1: Logótipo da empresa Condi Alimentar, S.A.
Fonte: <https://condi.pt/>

É uma das principais e mais inovadoras empresas no mercado das sobremesas em pó, tendo uma grande variedade de gelatinas, preparados para bolos, mousses e pudins. Lançou em Portugal, as primeiras gelatinas *Light*, adoçadas com Stevia, bem como gelatinas Zero, o que lhe permitiu ter o estatuto de líder de mercado na vertente das gelatinas sem açúcar (Nielsen, 2018).

Em 2018, lançou os pudins Bio Baunilha Bourbon e Chocolate, as primeiras sobremesas em pó biológicas desenvolvidas e fabricadas em Portugal, assim promovendo o aumento da oferta de produtos saudáveis.

Esta empresa possui um Departamento de Investigação e Desenvolvimento (I&D), que tem como objetivo desenvolver novos produtos ou melhorar, continuamente, formulações já existentes. Antes de cada novo produto ser lançado para o mercado, primeiramente, é-lhe feita uma avaliação sensorial através de um painel de provadores e, também, são efetuadas avaliações microbiológicas e físico-químicas, de forma a saber se aquele novo produto cumpre os requisitos de qualidade e de segurança.

Para além da área de desenvolvimento, um dos grandes objetivos desta empresa é assegurar a segurança alimentar dos seus produtos. Atualmente, é certificada pela *IFS Food v 6.1*, tendo obtido uma qualificação de “High Level” e possui, igualmente, o Sistema de Certificação de Segurança Alimentar NP EN ISO 22000:2005, passado pela empresa *Société Générale de Surveillance* (SGS).

1.2) Estudo de Vida Útil de Produtos Alimentares

Num produto alimentar, o fator de vida útil é importante, pois informa o consumidor sobre qual é o período de tempo que esse alimento se mantém em condições aceitáveis para consumo antes de sofrer deterioração, se tiverem sido cumpridos os requisitos de armazenamento (Granato et al., 2010).

Segundo as normas do *Institute of Food Science and Technology* (IFST), o período de vida útil de um alimento, sob condições de armazenamento adequadas, significa que o período de tempo em que o produto alimentar (Hough & Garrita, 2012):

- Permanece seguro;
- Preserva as características químicas, microbiológicas e sensoriais desejáveis;
- Sustenta o seu valor nutricional conforme descrito no rótulo.

Através da definição de “Vida Útil de um Alimento” determina-se quais são os principais parâmetros a ter em conta durante a avaliação desse período e refere-se, também, a importância das condições de armazenamento que estão relacionadas com esse período (Hough & Garrita, 2012).

Por outro lado, a Comissão do *Codex Alimentarius* decreta que o conceito de vida útil é “o período durante o qual um produto alimentar mantém a sua segurança microbiológica e a sua qualidade sensorial a uma temperatura de armazenamento específica” (*Codex Alimentarius Commission*, 1999). Porém, a *New Zealand Food Safety Authority* (NZFSA, 2005) afirma que este conceito é um guia para o consumidor que informa o período de tempo em que os alimentos podem ser conservados antes de se deteriorarem, desde que tenham sido armazenados nas condições recomendadas. Informa, também, que o prazo de conservação de um produto alimentar começa a partir do momento em que ele é preparado ou fabricado e que a sua duração varia consoante o tipo de ingredientes e embalagens utilizados, com o processo de fabrico e com o modo de armazenamento dos alimentos. Esta indicação encontra-se inscrita no rótulo mencionada em forma de data, que faz referência ao período de vida útil desse alimento.

É importante validar o tempo de vida útil de um dado produto com o objetivo de garantir a segurança microbiológica dos alimentos, nomeadamente, dos produtos alimentares que são perecíveis ou daqueles que estão prontos para consumo, porque estes são mais suscetíveis em desenvolver microrganismos patogênicos como, por exemplo, a *Listeria monocytogenes* (FSAI, 2019). A avaliação sensorial é outro fator-chave que determina o tempo de vida útil de muitos produtos alimentares, dado que, existem alimentos que podem estar microbiologicamente estáveis, mas que devido a alterações nas suas propriedades sensoriais ao longo do tempo, podem ser rejeitados pelos consumidores (Hough et al., 2003).

Para qualquer alimento, o tempo de vida útil depende das suas (Monteiro, 2016; Moschopoulou et al., 2019):

- **Caraterísticas intrínsecas, que são aquelas que estão relacionadas com o próprio alimento:** ingredientes, atividade da água (a_w), acidez do alimento (pH), potencial oxidação-redução (E_h), presença de substâncias antimicrobianas naturais, estrutura biológica, enzimas, microflora natural e composição química do alimento;
- **Caraterísticas extrínsecas, tais como:** o processo de fabrico, condições de armazenamento (humidade relativa (HR), temperatura e composição atmosférica envolvente), embalagem, questões logísticas e de retalho e manipulação do consumidor.

A interação entre fatores intrínsecos e extrínsecos tem grande relevância no tempo de vida útil de um dado alimento, porque pode promover ou não alterações microbiológicas e não microbiológicas (físicas-químicas e organolépticas) nos alimentos (Kilcast & Subramaniam, 2000; Moschopoulou et al., 2019) (**Tabela 1.1**).

Tabela 1.1: Mudanças microbiológicas, físicas, químicas e induzidas pela luz que ocorrem durante o tempo de vida útil de um alimento.

Tipo de Mudança	Mudanças Físicas	Ganho ou perda de humidade
		Transferência de vapor de água; Sublimação de gelo
		Perda do sabor característico; Desenvolvimento de odor ou sabor indesejado (“mancha”)
		Perda de dióxido de carbono
		Cristalização e alterações de textura
		Desestabilização e decomposição da emulsão
		Sinérese
	Mudanças Químicas e Bioquímicas	Lesão de arrefecimento
		Hidrólise de ácidos gordos
		Oxidação de gorduras, proteínas, pigmentos e vitaminas
		Acastanhamento não-enzimático e enzimático
	Mudanças induzidas pela luz	Perda de sabores, descoloração oxidativa e interações entre os alimentos e a embalagem
		Foto-oxidação de vitaminas, oxidação induzida pela luz, perda de cor natural e característica
Mudanças Microbiológicas	Crescimento de microrganismos patogénicos, toxinas microbianas	
	Deterioração provocada pelo crescimento de bactérias, leveduras e bolores	

Fonte: Adaptado de (Moschopoulou et al., 2019).

1.2.1) Fatores intrínsecos que influenciam a “Vida Útil de um Alimento”

1.2.1.1) Ingredientes

Num alimento, as gorduras, hidratos de carbono, vitaminas e proteínas são os componentes alimentares que, sob a influência da microflora, das enzimas e das condições de processamento, mais se alteram durante a vida útil. Como muitos dos alimentos gordos são ricos em ácidos gordos insaturados e não contêm substâncias antioxidantes como, por exemplo, compostos fenólicos, ácido ascórbico ou alfa-tocoferol, isso faz com que estes ácidos sejam mais suscetíveis à oxidação durante as fases de produção e armazenamento. Para este tipo de alimentos é importante utilizar antioxidantes de forma a prolongar o seu prazo de validade. Para além dos antioxidantes, podem ser usadas outras substâncias que ajudam a inibir a alteração dos alimentos, como é o caso dos edulcorantes que podem

funcionar como humectantes ou crioprotetores, se se tratar de produtos congelados (Moschopoulou et al., 2019).

1.2.1.2) Atividade da Água (a_w)

Nos alimentos, a água é o substrato que participa em várias reações químicas e bioquímicas. Os microrganismos não crescem em meios totalmente secos, visto necessitarem de água para se poderem desenvolver e desempenhar as suas funções de sobrevivência, metabolismo e reprodução. Para que tal aconteça, é necessário que exista água livre, isto é, água que não se encontra ligada a nenhum outro componente do alimento, estando assim disponível para o crescimento dos microrganismos (Neto et al., 2005; Monteiro, 2016; Moschopoulou et al., 2019).

Durante a fase de armazenamento, os alimentos podem ganhar ou perder humidade consoante as suas características e as condições ambientais onde estão inseridos. O ganho de humidade nos alimentos pode provocar alterações na textura, ao torná-los mais viscosos, granulados ou suaves; pode originar odores ou sabores desagradáveis; ou pode provocar alterações bioquímicas, ao permitir a germinação de esporos em alimentos em pó (Roos, 2001). Também, pode promover o escurecimento não-enzimático (reações de Maillard), a oxidação lipídica e a ação enzimática (Oliveira et al., 2019).

A atividade da água (a_w) é um fator fundamental no controlo de qualidade de um dado alimento, visto que expressa a quantidade de água disponível que se encontra no estado livre, nesse produto alimentar. O valor é determinado através da razão ($a_w = P/P_0$) entre a pressão de vapor de água de uma solução ou alimento (P) e a pressão de vapor de água pura (P_0) à mesma temperatura. Este valor pode variar entre 0 e 1, sendo que o valor 1 representa a água pura. Logo, quanto maior for o valor de atividade da água (a_w), mais propício é o desenvolvimento de microrganismos no alimento, levando, assim, à sua deterioração. Os alimentos com um valor abaixo dos 0,60 são aqueles que têm um teor baixo de humidade, o que raramente permite o desenvolvimento de microrganismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras) (Neto et al., 2005; Ambifood, 2016; Esbelin et al., 2018; Moschopoulou et al., 2019). Existem diversos métodos que permitem calcular o teor de a_w num alimento, que são: o higrómetro (polímero ou cabelo, ponto de orvalho e elétrico), o manómetro, a depressão do ponto de congelação, o psicrómetro, o termopar e o método *isopiestic*. Estes métodos variam entre eles em termos de custo, complexidade, medição de velocidade, reprodutibilidade, linearidade, precisão, calibração, facilidade de utilização e estabilidade (Oliveira et al., 2019).

Cada tipo de microrganismo para se poder desenvolver no alimento apresenta um valor mínimo, ótimo e um valor máximo de a_w . No entanto, estes valores podem variar consoante a interação com outros fatores/caraterísticas do alimento (Baptista & Venâncio, 2003; Luzzi, 2010).

Normalmente, as bactérias e as leveduras são microrganismos que requerem valores de a_w acima dos 0,80 (**Tabela 1.2A**), enquanto que os fungos filamentosos necessitam de menos água para se desenvolverem. Por exemplo, o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria que se multiplica em meios com uma atividade da água de 0,86. Durante o seu metabolismo liberta água para o meio, o que leva a um aumento do a_w do alimento. Com um valor de a_w superior, isso vai fazer com que haja um aumento no crescimento de outros microrganismos que necessitam de valores de a_w maiores para se

desenvolverem, levando, assim, à deterioração do produto alimentar (Baptista & Venâncio, 2003; Neto et al., 2005; Oliveira et al., 2019).

A maioria das leveduras e fungos miceliais crescem em alimentos que possuem uma atividade de água entre os 0,86-0,88, ao passo que alguns fungos filamentosos podem crescer num meio com um a_w de até 0,80 (**Tabela 1.2B**). Nos alimentos, o risco associado aos fungos é, também, devido à presença de micotoxinas que são produzidas por estes. Conseguem surgir no produto final porque estas substâncias químicas tóxicas têm a capacidade de resistir ao processamento que é feito ao alimento. Por norma, os fungos não conseguem germinar e produzir as suas micotoxinas em alimentos com um a_w inferior a 0,60, no entanto mantêm a sua viabilidade e voltam a retomar o seu metabolismo quando as condições estiverem propícias para o seu desenvolvimento. Todavia, existem fungos que conseguem desenvolver-se em alimentos que possuem uma menor quantidade de água livre. Como é o caso da levedura *Zygosaccharomyces rouxii* que, sob a presença de frutose, consegue desenvolver-se em produtos alimentares que tenham um a_w de 0,62 (Baptista & Venâncio, 2003; Neto et al., 2005; Henriques, a) 2014).

O valor de a_w a que se verifica a produção de micotoxinas também pode ser afetado por outras condições, como, por exemplo, a temperatura. Num estudo realizado por Leggieri et al., (2017) utilizou-se o meio *Czapek Yeast Agar* (CYA) com o intuito de inocular fungos produtores de micotoxinas que se encontram em queijos. Inicialmente, este meio tinha uma atividade de água de 0,99 e, posteriormente, com a adição de cloreto de sódio (NaCl) numa concentração de 7,01 g/100ml verificou-se um decréscimo no valor de a_w deste meio para os 0,96. Após se ter aumentado a concentração de NaCl para 39,90 g/100 ml, notou-se que o a_w voltou a decrescer, neste caso para o valor de 0,78. Os autores verificaram que a produção de micotoxinas dependia da combinação entre os valores de a_w e a temperatura, sendo mais elevada entre os 15 e os 25 °C e na gama de a_w entre 0,96 e 0,99.

Tabela 1.2A: Valores mínimos, ótimos e máximos de atividade da água (a_w) para o crescimento de algumas bactérias patogénicas que se desenvolvem nos alimentos.

	Organismo	Mínimo	Ótimo	Máximo
Bactérias	<i>Campylobacter spp.</i>	0,98	0,99	
	<i>Shigella spp.</i>	0,97		
	<i>Vibrio vulnificus</i>	0,96	0,98	0,99
	<i>Salmonella spp.</i>	0,94	0,99	> 0,99
	<i>Bacillus cereus</i>	0,93		
	<i>Clostridium perfringens</i>	0,943	0,95 – 0,96	0,97
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,92		

Fonte: Adaptado de (Baptista & Venâncio, 2003).

Tabela 1.2B: Valores mínimos aproximados de atividade da água (a_w) que promovem o crescimento de alguns fungos e leveduras nos alimentos.

Fungos	Organismo		Mínimo
		<i>Botrytis cinerea</i>	
	<i>Trichosporon pullulans</i>		0,91
	<i>Penicillium patulum</i>		0,81
	<i>Aspergillus conicus</i>		0,70
	<i>Xeromyces bisporus</i>		0,61
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Crescimento		0,70
	Produção Micotoxina (Aflatoxinas)		0,80
<i>Penicillium verrucosum</i>	Crescimento		0,81
	Produção Micotoxina (Ocratoxina A)		0,83 – 0,90

Fonte: Adaptado de (Baptista & Venâncio, 2003; Jay et al., 2008).

Uma das formas de reduzir a atividade de água e, conseqüentemente, diminuir o crescimento microbiano num dado alimento pode ser feita através (Baptista & Venâncio, 2003; Henriques, 2014; FSAI, 2019):

- Da utilização de solutos como, por exemplo o sal e o açúcar;
- Da ligação da água com compostos macromoleculares;
- Do processo de congelamento de forma a tornar a água livre indisponível;
- De processos de secagem, cozedura ou liofilização com o objetivo de remover a água livre.

1.2.1.3) Acidez do Alimento (pH)

O grau de acidez, neutralidade ou basicidade de uma solução é medido através da determinação do valor de pH. Este valor define a atividade relativa de iões de hidrogénio de uma solução, ou seja, a determinação do pH de um alimento calcula-se através do logaritmo decimal do inverso da concentração do ião de hidrogénio no produto alimentar. O valor calculado pode variar entre 0 e 14, sendo que pH = 7 é o centro da escala de medição deste parâmetro, o que representa a neutralidade, isto é, indica que esse alimento não apresenta propriedades ácidas ou básicas. Valores acima de 7 significam que os alimentos têm propriedades básicas (ou alcalinas), enquanto que valores de pH abaixo de 7 indicam que a constituição dos alimentos exhibe propriedades ácidas. Logo, num alimento, quanto maior for a concentração de iões hidrogénio, menor será o valor de pH e, portanto, mais ácido será o alimento (Baptista & Venâncio, 2003; Pereira, 2016).

No alimento, o pH é um parâmetro físico-químico crítico que pode estimular ou inibir o crescimento microbiano e as reações químicas ou enzimáticas. Devido a isso, este parâmetro pode afetar o efeito de estabilidade dos produtos alimentares. Para além disto, o pH pode, também, influenciar a cor e a textura dos alimentos. O método de medição de pH mais usado é o eletrodo de vidro, isto porque, as suas respostas são independentes das interferências das reações redox, devido à sua alta reprodutibilidade e longa duração e ao curto tempo de equilíbrio do potencial elétrico. Como os microrganismos patogénicos não conseguem desenvolver-se a pHs baixos, existem métodos de conservação que reduzem o pH com o objetivo de aumentar o tempo de vida útil do produto alimentar

como, por exemplo, a acidificação, que pode ser feita através da adição de ácidos orgânicos fracos (ácido acético, nas conservas de pickles, ou ácido cítrico) ou através de processos fermentativos. No entanto, estes processos de conservação apresentam desvantagens na qualidade sensorial ao produzirem no alimento um sabor e odor desagradáveis associados aos ácidos (Beales, 2004; Henriques, b) 2014; Christensen et al., 2018; Oliveira et al., 2019).

Tal como na atividade da água, os microrganismos têm valores mínimos, ótimos e máximos de pH para se desenvolverem. Contudo, estes valores podem variar consoante a interação deste parâmetro com outros fatores, tais como: a atividade da água, o potencial oxidação-redução ou a temperatura, de forma a impedir o crescimento microbiano. Exemplo disso são os fungos e as leveduras que dependem da interação dos fatores pH e a_w , porque estes parâmetros dão a aptidão necessária para que estes microrganismos consigam desenvolver-se, numa gama de valores de pH mais ácida, relativamente às bactérias (Baptista & Venâncio, 2003).

A maioria dos microrganismos consegue desenvolver-se melhor numa gama de pH próximos do valor neutro (6,6 – 7,5) (Jay et al., 2008).

Por norma, as bactérias conseguem desenvolver-se numa faixa de valores de pH entre 4,0 a 9,0 (**Tabela 1.3**). No entanto, a bactéria *Clostridium botulinum* cresce e produz a sua toxina a um pH mínimo de 4,5, enquanto outras crescem mais lentamente em alimentos com pHs inferiores a 4,5 (Fani, 2012).

Por outro lado, as leveduras crescem numa gama de pHs entre 1,5 a 8,0, ao passo que os bolores conseguem multiplicar-se numa faixa de pHs entre 1,5 a 11,0. Os fungos filamentosos, como são produtores de ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido láctico, oxalato e ácido itacónico), têm a capacidade de mudar o pH do meio com o intuito de estimular o desenvolvimento destes microrganismos no alimento. Aquando da produção desses ácidos pelos microrganismos, os alimentos têm um mecanismo de defesa designado por “capacidade tampão”. Esta característica dá ao produto alimentar a competência de manter o seu pH inalterável, de modo a inibir o crescimento dos microrganismos (Baptista & Venâncio, 2003; Fani, 2012; Wakai et al., 2017).

Tabela 1.3: Valores mínimos, ótimos e máximos de pH para desenvolvimento de algumas bactérias patogénicas.

	Organismo	Mínimo	Ótimo	Máximo	
Bactérias	<i>Clostridium perfringens</i>	5,5 – 5,8	7,2	8,0 – 9,0	
	<i>Bacillus cereus</i>	4,9	6,0 – 7,0	8,8	
	<i>Campylobacter spp.</i>	4,9	6,5 – 7,5	9,0	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4,8	7,8 – 8,6	11,0	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	4,39	7,0	9,4	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	crescimento	4,0	6,0 – 7,0	10,0
		toxina	4,5	7,0 – 8,0	9,6

Fonte: Adaptado de (Baptista & Venâncio, 2003).

1.2.1.4) Potencial Oxidação-Redução (E_h)

Os processos de oxidação e redução, encontram-se associados às transferências de eletrões que acontecem entre compostos e elementos químicos e são imprescindíveis para os microrganismos na obtenção de energia por fosforilação oxidativa. Estes processos ocorrem em simultâneo, visto que o

processo de oxidação corresponde à perda de eletrões, enquanto que no de redução ocorre um ganho de eletrões. Caso o equilíbrio esteja mais direcionado para o estado oxidado, então vai-se criar um potencial positivo porque a amostra está a receber eletrões, o que indica que esse meio é oxidante. Se o equilíbrio favorecer o processo de redução, vai criar-se um potencial negativo devido ao facto de a amostra estar a ceder os seus eletrões, mostrando que esse meio é um meio redutor. O potencial de oxidação-redução (E_h) é quantificado através do uso de um eléctrodo de metal inerte (geralmente de platina) que se encontra submerso no meio e é medido em milivolts (mV). Tal como nos fatores referidos anteriormente, o potencial oxidação-redução também é influenciado pela ação de outros fatores, tais como: o pH, a atividade microbiana, a capacidade de equilíbrio entre grupos oxidantes e redutores e a disponibilidade de oxigénio (Baptista & Venâncio, 2003; Fani, 2012; Henriques, a) 2014; Moschopoulou et al., 2019).

O potencial *redox* influencia a microflora do alimento, bem como as reações químicas e bioquímicas que ocorrem nele. No alimento, o crescimento dos microrganismos é influenciado de acordo com a disponibilidade de oxigénio no meio. A classificação dos microrganismos relativamente ao potencial *redox* e à tolerância ao oxigénio, bem como exemplos de bactérias para cada uma das categorias da classificação, estão descritas na **tabela 1.4** (Fani, 2012; Matos, 2014; Moschopoulou et al., 2019).

Tabela 1.4: Classificação dos microrganismos quanto ao seu potencial *redox* e tolerância ao oxigénio e exemplos de bactérias para cada classificação.

Classificação	Potencial <i>Redox</i>	Tolerância ao Oxigénio	Exemplos de Bactérias
Aeróbios Obrigatórios	+ 500 mV a + 300 mV	Crescem na presença de oxigénio	<i>Bacillus cereus</i>
Anaeróbios Obrigatórios	+ 100 mV a - 250 mV	Não crescem na presença de oxigénio	<i>Clostridium botulinum</i>
Anaeróbios Facultativos	+ 300 mV a - 100 mV	Utilizam oxigénio para se desenvolver, mas conseguem, também, crescer na ausência deste	<i>Escherichia coli</i>
Microaerófilos	Ligeiramente redutor	Requerem só uma pequena quantidade de oxigénio	<i>Campylobacter spp.</i>

Fonte: Fani, 2012; Matos, 2014.

Maioritariamente, os fungos são aeróbios, principalmente, os filamentosos, enquanto as leveduras podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas. Na ausência de oxigénio, os fungos filamentosos não se conseguem desenvolver, o que leva à inibição destes microrganismos no alimento (Baptista & Venâncio, 2003; Fani, 2012).

1.2.1.5) Composição Química dos Alimentos

Os microrganismos necessitam de nutrientes essenciais para se desenvolverem e realizarem as suas funções metabólicas. A quantidade e o tipo de nutrientes necessários para o crescimento de cada microrganismo no alimento variam de espécie para espécie. À medida que a população de microrganismos aumenta no alimento, a disponibilidade de nutrientes vai decrescendo. O desenvolvimento desses microrganismos no alimento parará quando acabar a disponibilidade de nutrientes essenciais para o seu crescimento. Existem várias classes de nutrientes que são utilizadas

pelos microrganismos para se desenvolverem no produto alimentar, nomeadamente (Baptista & Venâncio, 2003; Fani, 2012):

- **Fonte de energia:** Os microrganismos utilizam os hidratos de carbono (geralmente açúcares simples como a glucose), álcoois e aminoácidos como fontes de energia. No entanto, alguns microrganismos conseguem metabolizar, também, hidratos de carbono mais complexos (polissacáridos), como, por exemplo, o amido e a celulose, que se encontram em produtos vegetais, ou o glicogénio, que se encontra nos músculos dos tecidos animais, em açúcares mais simples. Os lípidos também podem ser utilizados como fonte de energia por microrganismos lipolíticos, como é o caso das bactérias do género *Pseudomonas*;
- **Azoto:** As principais fontes de azoto para os microrganismos são os aminoácidos, proteínas, péptidos e nucleótidos;
- **Vitaminas:** Os alimentos contêm a quantidade necessária de vitaminas essenciais para o desenvolvimento dos microrganismos, sendo que as mais importantes são as vitaminas do complexo B, como a biotina e o ácido pantoténico. As bactérias Gram-positivas necessitam de mais vitaminas, relativamente às Gram-negativas;
- **Sais minerais:** São essenciais por participarem em reações enzimáticas e por serem constituintes de biomoléculas como, por exemplo, ácidos nucleicos e proteínas. No entanto são utilizados em pequenas quantidades pelos microrganismos. O enxofre, o sódio, o fósforo, o potássio, o cálcio, o ferro, o magnésio e o manganês são os minerais principais usados durante o crescimento dos microrganismos.

A disponibilidade em nutrientes é essencial para garantir o crescimento dos microrganismos nos alimentos sendo também, no caso dos fungos filamentosos, essencial para a produção das suas micotoxinas (Baptista & Venâncio, 2003).

1.2.1.6) Estrutura Biológica do Alimento

Alguns alimentos de origem vegetal e animal possuem uma estrutura física que funciona como uma barreira de proteção contra a entrada de microrganismos, de forma a impedir danos no alimento e, conseqüentemente, dificultar a sua deterioração. Nesta categoria incluem-se estruturas como, por exemplo, a cobertura externa dos frutos e vegetais, as conchas e pele dos animais e as membranas e cascas dos ovos. Apesar destas estruturas poderem estar contaminadas com microrganismos, na maioria dos casos, eles não produzem as enzimas essenciais para as conseguir destruir, pelo que acabam por não se desenvolver, uma vez que não conseguem ter acesso à água e aos nutrientes contidos no alimento e que são essenciais para o seu crescimento. Feridas e outras lesões nestas estruturas possibilitam a infeção com microrganismos. Por exemplo, no caso das frutas e vegetais, a introdução de microrganismos pode advir dos danos ocorridos na casca durante a colheita, transporte

e/ou armazenamento ou, também, pelas picadas dos insetos (Baptista & Venâncio, 2003; Jay et al., 2008).

1.2.1.7) Constituintes Naturais com Atividade Antimicrobiana

A estabilidade microbiológica de alguns alimentos de origem animal ou vegetal pode derivar da existência de substâncias naturais que neles se encontram e que possuem atividade antimicrobiana. Exemplos destes alimentos são (Baptista & Venâncio, 2003; Jay et al., 2008; Carvalho, 2014; Vázquez et al., 2015; Heymann & Ebeler, 2016; Candan & Bagdath, 2017; De la Rosa et al., 2019):

- Algumas espécies vegetais contendo óleos essenciais e outras substâncias que possuem atividade antimicrobiana, como é o caso do eugenol existente no cravo-da-índia; da alicina do alho; do isotiocianato de alilo da mostarda, ou de múltiplos compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos e flavonóides (*figura 1.2*), que têm vindo a ser identificados em diversos alimentos vegetais;

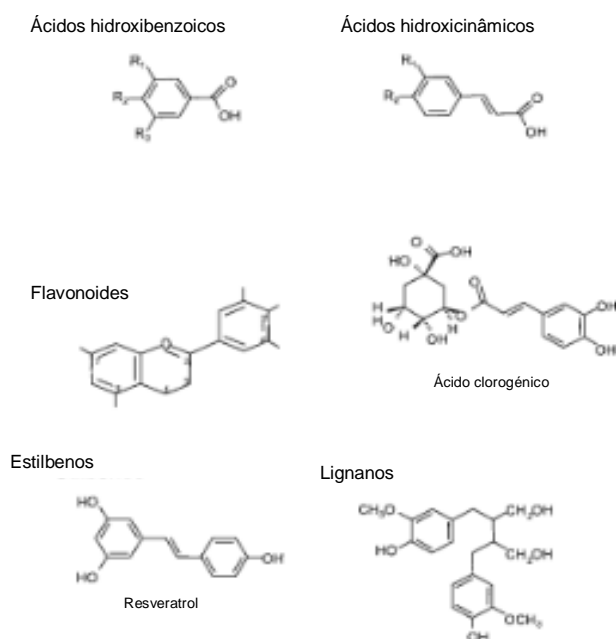


Figura 1.2: Estrutura química dos diferentes compostos fenólicos.

Fonte: Carvalho, 2014.

- No leite cru, o sistema lacto-ferrina, lacto-peroxidase e outras proteínas que se ligam ao ferro são substâncias que têm capacidade antimicrobiana, pois conseguem inibir o crescimento de microrganismos e, conseqüentemente, retardar a deterioração do leite;
- No ovo, a enzima lisozima (muramidase), confere atividade antimicrobiana, uma vez que é capaz de hidrolizar a parede celular das bactérias Gram-positivas. Outras proteínas da clara, ao serem capazes de ligar iões metálicos, conferem, igualmente, proteção antimicrobiana ao ovo.

Para além dos compostos previamente existentes nos alimentos, durante o processamento podem ainda formar-se outros compostos antimicrobianos, dos quais se destacam (Baptista & Venâncio, 2003):

- Produtos das reações de Maillard entre péptidos/aminoácidos e açúcares;
- Produtos formados à superfície de carnes e do pescado no decurso dos processos de fumagem;
- Antibióticos e outros antimicrobianos formados em processos fermentativos.

1.2.1.8) Atividade enzimática

As enzimas encontradas naturalmente nos alimentos podem estimular a deterioração do produto alimentar. Por exemplo, nas frutas e nos vegetais, após a colheita, a maioria das enzimas ainda se encontra ativa. Na fase de maturação, isto é, durante o armazenamento pós-colheita podem ocorrer alterações nos atributos de qualidade do alimento nomeadamente na cor, textura, sabor e valor nutricional. Por exemplo, as polifenoloxidasas existentes por exemplo nas polpas de diversos frutos, quando em contato com o oxigénio, induzem a oxidação enzimática dos compostos fenólicos, com produção de compostos de cor escura, fenómeno conhecido como escurecimento enzimático, e que limita o tempo de prateleira destes produtos (Terefe et al., 2013; Moschopoulou et al., 2019).

As atividades enzimáticas dos microrganismos que crescem nos alimentos podem catalisar reações, em cujo final se originam sabores desagradáveis, como o ranço, devido à lipólise, ou os péptidos amargos resultantes da proteólise. Apesar do crescimento microbiano estar maioritariamente associado com a diminuição do tempo de prateleira dos alimentos, existem microrganismos seletivos que são adicionados durante o tempo de processamento, como sucede com os iogurtes ou os produtos à base de carne fermentada, de forma a produzir componentes que vão ser essenciais para estabilizar a qualidade destes produtos alimentares contra microrganismos patogénicos (Gava et al., 2009; Moschopoulou et al., 2019).

1.2.2) Fatores Extrínsecos

1.2.2.1) Temperatura

A temperatura é um dos fatores extrínsecos que mais influencia o crescimento de microrganismos, e as reações químicas e enzimáticas que ocorrem no alimento. Os microrganismos possuem uma gama de temperaturas mínima, ótima e máxima, com as quais conseguem desenvolver-se. Assim, os microrganismos dividem-se em quatro grupos, sendo classificados de acordo com as temperaturas em que melhor se desenvolvem (**Tabela 1.5**) (Baptista & Venâncio, 2003; Fani, 2012; Saraiva et al., 2019).

Tabela 1.5: Gama de temperaturas de crescimento para cada grupo de microrganismos.

Grupo	Temperatura (°C)		
	Mínima	Ótima	Máxima
Termófilos	40 – 45*	55 – 65**	60 – 90*
Mesófilos	7***	30 – 37***	35 - 47*
Psicrófilos	(-5) – (+5)*	12 - 15*	15 - 20*
Psicrotróficos	0 - 7**	20 – 30**	Até 43

Fonte: *Adaptado de (Baptista & Venâncio, 2003). **Adaptado de (Jay et al., 2008). ***Adaptado de (Saraiva et al., 2019).

O crescimento microbiano é resultado do binômio entre tempo e temperatura (Baptista & Venâncio, 2003). A maior parte das bactérias patogênicas pertence ao grupo dos mesófilos (30 – 45 °C) (**Tabela 1.6**). Enquanto isto, as bactérias psicrotróficas constituem um grande problema para os alimentos que são refrigerados/congelados, porque estes microrganismos conseguem permanecer viáveis sob temperaturas de refrigeração/congelamento (Fani, 2012).

Os fungos conseguem crescer numa gama de temperaturas mais ampla por comparação com as bactérias, rondando as suas temperaturas ótimas e mínimas entre os 25 e os 30°C, variando as máximas entre os 40 e os 45°C. Apesar destas serem as temperaturas ideais de crescimento para a maioria dos fungos, existem algumas espécies que se conseguem desenvolver a temperaturas de refrigeração, como é o caso do *Penicillium roquefort*, enquanto outras resistem a temperaturas de 55 °C, como é o caso do *Aspergillus fumigatus* (Baptista & Venâncio, 2003; Baptista & Linhares, 2005).

Tabela 1.6: Valores mínimos, ótimos e máximos de temperatura (°C) para desenvolvimento de algumas bactérias patogênicas.

Organismo	Mínimo	Ótimo	Máximo	
	<i>Bacillus cereus</i>	5	28 - 40	55
<i>Clostridium botulinum</i> tipo A e B ^{a)}	10 - 12	30 - 40	50	
<i>Clostridium perfringens</i>	12	43 - 47	50	
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	30 - 37	45	
<i>Shigella</i> spp.	7	37	45 - 47	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5	37	43	
<i>Staphylococcus aureus</i>	crescimento	7	35 - 40	48
	toxina	10	40 - 45	46

^{a)} proteolítico. Fonte: Adaptado de (Baptista & Venâncio, 2003).

1.2.2.2) Humidade Relativa (HR)

A humidade relativa (HR) do ar mede a relação entre a pressão de vapor do ar e a saturação da sua pressão de vapor. A HR atua diretamente na atividade da água (a_w) de um alimento. Em níveis estáveis de temperatura e de vapor, o valor de a_w corresponde ao da humidade relativa do ar. Assim, pode-se calcular a percentagem do equilíbrio de humidade relativa (EHR) ao multiplicar o valor da atividade da água por 100. Os produtos alimentares que contêm uma baixa atividade da água e que se encontram armazenados num ambiente onde a humidade relativa é alta, absorvem-na, o que vai aumentar o seu a_w , favorecendo o crescimento microbiano e a atividade enzimática. (Baptista & Venâncio, 2003; Fani, 2012; Esbelin et al., 2018; Moschopoulou et al., 2019). A mudança na humidade relativa dos alimentos poderá ter um grande impacto na respetiva segurança e qualidade, ao serem induzidas alterações irreversíveis na sua textura, assim como poderá provocar a deterioração e/ou crescimento de agentes

patogênicos durante a fase de armazenagem. Como os consumidores procuram alimentos de alta qualidade, a variação da humidade relativa nas embalagens e nos alimentos embalados é controlada e monitorizada, o que fornece informações essenciais acerca da evolução da qualidade dos alimentos embalados (Bibi et al., 2016).

Este parâmetro é influenciado pela temperatura, pelo que quanto maior for a temperatura de armazenagem, menor será a humidade relativa, e vice-versa (Baptista & Venâncio, 2003).

1.2.2.3) Composição atmosférica envolvente

A composição gasosa da atmosfera que envolve o alimento influencia o crescimento dos microrganismos. Diversos gases, como é o caso do ozono (O_3), do dióxido de carbono (CO_2) e do oxigénio (O_2), dependendo da sua concentração, podem inibir o crescimento dos microrganismos. Quando a atmosfera tem altas concentrações de ozono e de oxigénio, isso vai fazer com que haja uma maior prevalência no crescimento de microrganismos aeróbios, desde que as concentrações se encontrem em valores toleráveis que não cheguem a ser tóxicos para este tipo de microrganismos. Por outro lado, no caso dos anaeróbios como, por exemplo, a bactéria *Clostridium botulinum*, estas concentrações produzem um efeito de toxicidade, uma vez que se trata de uma bactéria anaeróbia. A maioria das bactérias patogênicas são classificadas como anaeróbias facultativas, como é o caso das bactérias da família das *Enterobacteriaceae* ou, então, da *Listeria monocytogenes*. Deste modo, o dióxido de carbono tem um efeito inibidor sobre o crescimento microbiano, principalmente para os microrganismos aeróbios. Contudo, quando este gás se encontra em altas concentrações na atmosfera, pode inibir o crescimento de outro tipo de microrganismos (Baptista & Venâncio, 2003; Fani, 2012; Henriques, a) 2014).

Com o objetivo de inibir o crescimento microbiano, de forma a aumentar o tempo de prateleira dos alimentos, utilizam-se métodos combinados com o controlo de temperatura e da atmosfera. Destes métodos, destacam-se (Baptista & Venâncio, 2003; Fani, 2012):

- **Embalagem em atmosfera controlada** (CAP – *Controlled Atmosphere Packaging*);
- **Embalagem em atmosfera modificada** (MAP – *Modified Atmosphere Packaging*);
- **Embalagem a vácuo**;
- **Armazenagem em atmosfera controlada** (CAS – *Controlled Atmosphere Storage*).

O princípio de utilização das embalagens MAP (**figura 1.3**) é substituir o ar que existe no seu interior por uma mistura de dois ou três gases de concentração otimizada (Santos & Oliveira, 2012). Os alimentos encontram-se protegidos por uma atmosfera modificada, o que pode prevenir a deterioração provocada pelo crescimento microbiano e a contaminação associada à síntese de micotoxinas, evitando a perda de peso e, conseqüentemente, prolongando o seu tempo de vida útil (Baptista & Venâncio, 2003; Han et al., 2016). Neste tipo de embalagem é importante ter em conta o tipo de material que é utilizado para reter a atmosfera durante um longo período de tempo. Para além do tipo de material da embalagem que é usado, é preciso determinar a permeabilidade do filme ao vapor de água e aos

gases mas, também, a perícia em preservar a totalidade da selagem da embalagem e a resistência mecânica durante a manipulação, de forma a que se consiga prolongar ao máximo o tempo de vida útil do produto alimentar. Neste tipo de método existem duas maneiras de se conseguir modificar a atmosfera que se encontra em contacto com o alimento: através de uma forma ativa ou de uma forma passiva. Na forma passiva, o alimento é embalado com ar normal, sendo a embalagem selada com um filme permeável. Assim, o alimento vai estabelecer trocas gasosas com a atmosfera durante a sua fase de respiração, o que vai levar a um aumento de CO_2 e a um decréscimo de O_2 no interior da embalagem. A permeabilidade deste filme vai estabelecer um equilíbrio entre a atmosfera exterior e a interior e, conseqüentemente, preservar a qualidade do alimento durante algum tempo. Por seu lado, na forma ativa, antes da selagem da embalagem é injetada uma mistura de gases com concentração conhecida para o seu interior. A mistura de gases e que é injetada no interior da embalagem, de forma a manipular a quantidade de O_2 e de CO_2 , é escolhida consoante o filme e o alimento, para que se consiga preservar as características organolépticas do produto, impedir que haja desenvolvimento microbiano e, também, para controlar as taxas de respiração do alimento (Santos & Oliveira, 2012; Fagundes et al., 2015).

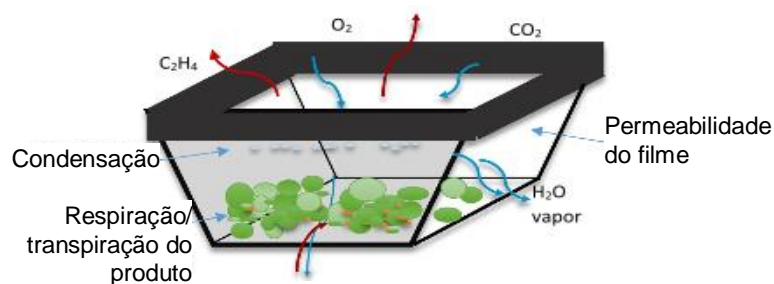


Figura 1.3: Dinâmica da atmosfera dentro de uma embalagem em atmosfera modificada.

Fonte: Adaptado de (Opara et al., 2019).

Nestes métodos, os gases mais usados são o dióxido de carbono e o azoto. Quando existe um aumento de dióxido de carbono na atmosfera devido a uma redução na temperatura, isso vai provocar que a solubilidade deste gás também aumente no alimento, visto que ele é solúvel em gordura e água (Baptista & Venâncio, 2003; Santos & Oliveira, 2012). Ao dissolver-se, o pH do alimento tende a diminuir.

Denomina-se por “atmosfera controlada”, quando o armazenamento de alimentos é feito com atmosferas gasosas como, por exemplo, com dióxido de carbono em quantidades previamente definidas. O CO_2 é utilizado, por exemplo, para retardar o aparecimento de fungos filamentosos nas frutas ou, então, para aumentar o tempo de prateleira das carnes (Baptista & Venâncio, 2003).

O azoto (N_2) não apresenta características antimicrobianas, visto que é um gás inerte e sem sabor. É utilizado como substituto do oxigénio na embalagem no caso dos alimentos sensíveis à oxidação e pode ser colocado individualmente ou em combinação com o dióxido de carbono, de forma a inibir, indiretamente, os microrganismos aeróbios devido à sua baixa solubilidade, quer na gordura quer em água. Este gás não é absorvido pelo alimento, o que previne o colapso da embalagem devido à dissolução do dióxido de carbono (Baptista & Venâncio, 2003; Santos & Oliveira, 2012).

O ozono (O_3) serve para conservar certos vegetais e frutas, mas não serve para alimentos que sejam ricos em gordura, pois ele acelera o fenômeno de oxidação. Para além disso, em conjunto com o dióxido de carbono, retarda as mudanças que ocorrem na superfície de carnes que já estejam armazenadas há algum tempo (Baptista & Venâncio, 2003). Contudo, é utilizado de uma forma restrita, tal e qual, como o monóxido de carbono que é usado nas carnes vermelhas, do óxido de etileno ou do óxido nitroso (Santos & Oliveira, 2012).

O oxigênio (O_2) é um gás reativo. Tal como o dióxido de carbono, é mais solúvel à medida que a temperatura diminui. Porém, não é utilizado frequentemente porque, como o ozono, participa nas reações de oxidação, o que facilita a degradação do alimento. O O_2 é utilizado na conservação de certos alimentos, pois é necessário para preservar a cor das carnes vermelhas; essencial para que os vegetais e os frutos continuem a respirar após a colheita (Santos & Oliveira, 2012).

Existem alguns gases nobres que têm o mesmo efeito que o gás N_2 e que são utilizados com o objetivo de preservar certos alimentos (Santos & Oliveira, 2012).

Este parâmetro extrínseco é influenciado por vários fatores extrínsecos e intrínsecos, tais como: a temperatura, o nível de contaminação e o tipo de microrganismos presentes inicialmente no produto, o quociente entre o volume de gás no *headspace* e o volume de produto e as propriedades de barreira da embalagem onde está inserido, a composição bioquímica do alimento e o filme. Quando existe interação entre os diferentes fatores, haverá alterações na extensão de proteção conferida ao produto alimentar (Baptista & Venâncio, 2003).

1.2.2.4) Processamento nos alimentos

O tipo de processamento a que o alimento é sujeito pode torná-lo mais ou menos suscetível ao crescimento microbiano e afetar o seu tempo de vida útil. Por exemplo, o corte dos alimentos pode acelerar a sua deterioração por aumentar a área exposta (por exemplo, a carne picada), ou por ativar a ação de enzimas que aceleram a deterioração (por exemplo, nos vegetais cortados).

O processamento térmico - que pode ser realizado através da fritura, cozedura, secagem, pasteurização - é a técnica mais utilizada com a finalidade prolongar o tempo de vida útil de um produto alimentar. Contudo, esta técnica pode ser prejudicial aos alimentos, visto que pode afetar a sua composição nutricional, nomeadamente, o seu conteúdo em vitaminas sensíveis ao calor; pode causar também uma baixa eficiência na produção do alimento e, por fim, em certos procedimentos como, por exemplo, a utilização de grandes quantidades de água ou de agitação e aquecimento prolongados, provocam um somatório de gastos de energia e de tempo. Para contornar este problema são usados novos métodos “verdes e inovadores” de processamento que usam menos energia, tempo e água, como é o caso do aquecimento óhmico, do processamento com fluidos supercríticos e por microondas e do processamento assistido por ultrasons. Estes métodos podem ser operados em combinação com o tratamento térmico, para prolongar o tempo de prateleira do mesmo (Chemat et al., 2017; Moschopoulou et al., 2019).

1.2.2.5) Questões Logísticas e de Retalho

A carne, o peixe, os legumes e frutas e os produtos com leite são considerados alimentos perecíveis, pelo que as fases de transporte, armazenamento, distribuição e retalho destes alimentos têm de ser feitas segundo uma “cadeia de frio”. Existem diversos fatores que devem ser considerados durante o armazenamento a frio de certos alimentos e que são importantes para determinar a sua qualidade e a durabilidade dos seus prazos de validade, como é o caso da monitorização contínua da humidade e da temperatura. Outro fator crítico que pode desempenhar alterações desagradáveis à qualidade do alimento é a maneira como os consumidores manipulam os alimentos após a abertura da embalagem até à finalidade do prazo de validade deste. De forma a evitar uma maior deterioração do produto alimentar, os consumidores devem conhecer as regras de conservação de cada alimento, isto é, se após a abertura da embalagem este necessita ser armazenado em local fresco e seco ou em refrigeração, ou, então, se deve ser consumido no prazo de 3 dias ou outro que seja definido (Moschopoulou et al., 2019).

1.2.2.6) Embalamento

O principal objetivo de uma embalagem é proteger o alimento da deterioração mecânica e ambiental durante a distribuição e armazenamento e manter a qualidade e a segurança do mesmo podendo, assim, prolongar a sua data de validade (Cruz et al., 2019; Moschopoulou et al., 2019; Siracusa & Lotti, 2019). Uma embalagem tem toda a informação necessária para o consumidor acerca do produto alimentar, nomeadamente, os ingredientes, a informação nutricional, prazo de validade, o modo de preparação/consumo e, por fim, as diretrizes de como conservar o alimento (Siracusa & Lotti, 2019).

No entanto, podem ocorrer contaminações físicas, químicas e biológicas entre a embalagem, o alimento e o ambiente, que podem causar a deterioração do produto alimentar. Por exemplo, nas embalagens transparentes pode dar-se a perda de vitaminas e a oxidação da gordura devido à transmissão de luz. Mas, existem outras desvantagens ao conservar os alimentos em embalagens, pela razão destas serem, também, permeáveis a vapores, a gases e a moléculas de baixo peso molecular, bem como devido à migração de contaminantes químicos para os alimentos (Cruz et al., 2019; Moschopoulou et al., 2019; Siracusa & Lotti, 2019).

Existem diversas embalagens inteligentes, como os indicadores de temperatura temporal (TTIs) e a embalagem ativa, que permitem retardar as mudanças físicas, químicas e biológicas que ocorrem nos alimentos. Os TTIs têm a capacidade de prever ou monitorizar o prazo de validade e a segurança dos alimentos que se conservam nos frigoríficos. A embalagem ativa, por sua vez, possui componentes que podem libertar substâncias antimicrobianas, dióxido de carbono ou antioxidantes que vão atuar nos alimentos embalados ou que podem absorver etileno, oxigénio ou humidade proveniente dos alimentos embalados ou do meio ambiente que os envolve. O objetivo deste tipo de embalagem é melhorar ou manter a frescura e a qualidade do alimento embalado e, assim, prolongar o tempo de prateleira do mesmo (Moschopoulou et al., 2019).

Existe uma imensidão de plásticos diferentes que são utilizados nas embalagens pelas indústrias alimentares, sendo que os mais usados são os poliésteres, as polivinilinas e as poliolefinas, nomeadamente, o policarbonato (PC), o polipropileno (PP), poliestireno (PS), o politereftalato de etileno (PET), o policloreto de vinilideno (PVDC) e o polietileno de alta (HDPE) e de baixa (LDPE) densidade. Podem, igualmente, ser utilizadas combinações de vários tipos de camadas de plástico a que se dá o nome de multicamadas de plástico. A maior parte dos polímeros referidos pertencem a um grupo de termoplásticos que podem sofrer uma reciclagem mecânica, enquanto que as multicamadas de plástico não podem ser recicladas (Cruz et al., 2019).

A embalagem PET pode ser utilizada para embalar bebidas, como a água mineral, a cerveja, o leite e os refrigerantes e sumos. Também, pode ser usada para fabricar os tabuleiros utilizados em alimentos frescos, principalmente vegetais. Como este plástico é resistente a temperaturas elevadas, pode ser usado para o processamento por microondas e processamento térmico convencional. O PET produz acetaldeído (substância volátil), que afeta a qualidade do odor, sobretudo em bebidas como a coca-cola (Cruz et al., 2019).

O PP é formado por uma película clara e brilhante e por uma barreira moderada à humidade, odores e gases, pelo que não é afetado pelas alterações de humidade do ambiente. Apresenta alta resistência e resistência à perfuração. É utilizado para embalar alimentos, nomeadamente, *snack foods*, alimentos secos e biscoitos. Como este material de plástico é resistente a gorduras e óleos, é usado igualmente para embalar margarinas e manteigas (Cruz et al., 2019).

Relativamente ao polímero PC, este é transparente como o vidro, resistente ao calor e muito resistente à força mecânica. Por causa disso, é utilizado em recipientes que são submetidos a um enchimento ou processamento a quente. Este polímero é, frequentemente, utilizado em bandejas de forno para alimentos congelados e refeições preparadas, devido ao facto de também serem resistentes a baixas temperaturas, o que aumenta a tenacidade e a durabilidade da embalagem. É ainda utilizado em embalagens recicláveis de bebidas. Como é estável a altas temperaturas, é ainda utilizado em pacotes de cozedura (Cruz et al., 2019).

O plástico PS é um material transparente e muito frágil. É altamente permeável a vapores e gases, pelo que é adequado para embalar alimentos que tenham um tempo de vida útil curto como, por exemplo, iogurtes, café, sumos de fruta e gelados. É utilizado em embalagens para carne e biscoitos, mas também em caixas que embalam produtos frescos e ovos (Cruz et al., 2019).

Por fim, o PVDC é um copolímero termo-selável e termoretrátil que possui uma barreira elevada à humidade, gases, aromas e a produtos oleosos e gordos. É utilizado para proteger os alimentos que são sensíveis ao aroma e ao sabor, evitando que o alimento perca o sabor, bem como evita a entrada de compostos voláteis que podem danificar a qualidade do produto alimentar. Tem uma estrutura forte, pelo que é usado em embalagens flexíveis, através de filmes finos, e possui um tom acastanhado (Cruz et al., 2019).

Atualmente, as indústrias alimentares têm-se preocupado com o uso excessivo de plástico devido ao impacto negativo que este tem causado no meio ambiente. Por isso, têm procurado criar novas formas de produção e utilizar materiais de embalagem alimentar mais sustentáveis e naturais,

contribuindo, assim, de uma forma positiva para a saúde humana e para o meio ambiente (Cruz et al., 2019).

1.2.3) Estudos de Vida Útil num Alimento

São realizados estudos de vida útil com o objetivo de determinar qual o prazo de validade em que os produtos alimentares produzidos e transformados por uma determinada empresa são seguros, bem como saber até que ponto conseguem manter a sua qualidade, evitando, assim, a sub- ou a sobrevalorização do seu tempo de vida útil (Braz, 2017). Para isso, são criadas condições análogas às que acontecem no retalho e, de seguida, são selecionadas características de qualidade das amostras para serem submetidas a análises objetivas durante o seu período de armazenamento. O objetivo destes estudos é determinar qual o limite de aceitação em que o produto deixa de ser seguro para ser consumido e com uma qualidade alterável significativa (NZFSA, 2005; Ferreira, 2018).

Como a reprodutibilidade e a precisão do prazo de validade é afetada pelas características dos alimentos, é impossível estabelecer uma consistência reprodutível e precisa em todas as ocasiões, pois o prazo de validade não é um valor absoluto. Por isso, é necessário determinar uma margem de segurança do tempo de conservação dos alimentos. Esta margem só é aplicada após os exames efetuados às condições de todas as fases de processamento, armazenamento, distribuição e utilização, o que provocará uma diminuição no tempo de vida útil dos alimentos (FSAI, 2019).

Segundo a *New Zealand Food Safety Authority*, existem dois métodos principais que permitem estudar o tempo de vida útil de um alimento: o método indireto e o método direto (NZFSA, 2005).

O método direto é o mais usado e o procedimento exato é utilizado, unicamente, para cada alimento. Este método implica que o alimento seja armazenado, em determinadas condições pré-selecionadas, durante um período mais demorado, relativamente ao tempo de prateleira estipulado. Ao longo desse período, o alimento é estudado em intervalos de tempo regulares, de forma a determinar qual é o início da sua deterioração (NZFSA, 2005).

Por sua vez, o método indireto, utiliza um processo de armazenamento mais acelerado e/ou modelação microbiológica preditiva, com intuito de definir um prazo de validade para um determinado alimento, pelo que este procedimento só é usado em produtos alimentares que possuem um tempo de prateleira mais longo (NZFSA, 2005).

1.2.3.1) Método Direto

A *New Zealand Food Safety Authority* (NZFSA, 2005; Henriques, 2008; Galić, 2009; Pereira, 2014) afirma que, para se usar este método, tem que se seguir as seguintes seis etapas (**tabela 1.7**).

Tabela 1.7: Etapas do Método Direto para determinar o tempo de prateleira de um alimento.

Antes da comercialização do produto	
1. Identificação, no alimento, do agente causador da sua deterioração e/ou que o torna inseguro para ser consumido.	Identificar que conjunto de fatores intrínsecos (atividade de água; pH; disponibilidade de oxigênio) e/ou extrínsecos limitam/prolongam o prazo de validade do alimento. Deve-se ter em conta os processos de produção, embalagem e armazenamento, e o tempo que vai desde a compra de ingredientes para confeccionar o alimento e as embalagens, até ao momento do consumidor utilizar, finalmente, o produto. Para além destas diretrizes, a estação do ano influencia a degradação de certos alimentos, visto que muitos deles se deterioram no Verão, devido às elevadas temperaturas.
2. Que teste/ensaio deve ser utilizado.	O teste/ensaio selecionado tem como principal objetivo determinar a qualidade e a segurança de um alimento. Consoante o que for estudado no alimento, os testes podem ser divididos em três categorias principais: avaliação microbiológica, sensorial e físico-química.

Fonte: Adaptado de (NZFSA, 2005; Henriques, 2008; Galić, 2009; Pereira, 2014).

Tabela 1.7: Etapas do Método Direto para determinar o tempo de prateleira de um alimento. (Continuação)

Antes da comercialização do produto	
3. Construção do plano de estudo da vida útil de um alimento.	<p>A NZFSA afirma que antes de se iniciar um plano de estudo para avaliar o tempo de prateleira de um alimento, se deve, primeiramente, considerar estes pontos:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Quais os testes que devem ser processados? b) Qual o tempo necessário para a realização do estudo e qual a frequência com que os diferentes ensaios devem ser realizados? Sugere-se que os ensaios sejam feitos no início, no fim, e pelo menos, mais três, durante o tempo de vida útil do alimento em estudo. Sempre que possível deve haver outra amostragem, de forma a confirmar o tempo de vida útil do alimento em estudo; c) Qual a quantidade de amostras testadas em cada ensaio? No caso dos alimentos que estejam em embalagens triplicadas elas devem ser testadas, em cada amostragem; d) Qual o número de amostras necessárias durante o período de estudo do alimento? e) Em que altura se deve fazer o estudo do tempo de vida útil de um alimento? Preferencialmente, durante o período de Verão, visto que é a estação do ano na qual os produtos alimentares estão mais suscetíveis a se estragarem. Depois de finalizado o primeiro estudo, devem-se realizar mais para se ter em conta a variabilidade do produto. Logo, o processamento, a embalagem e o armazenamento utilizados durante a fase de estudo devem ser iguais aos utilizados para o produto final.
4. Execução do estudo do tempo de vida útil.	<p>Ao longo da execução do estudo do tempo de vida útil de um dado alimento, as amostras devem estar conservadas, desde a sua produção até à fase do consumo, nas mesmas condições que as amostras da produção normal. Caso seja impossível armazenar nas condições ideais de conservação, então devem ser guardadas a uma temperatura e humidade conhecidas.</p>
5. Determinação do tempo de vida útil de um alimento.	<p>Definir o tempo aceitável de qualidade e de segurança de um produto alimentar, sendo que o prazo de conservação deve ser o mais curto possível.</p> <p>O tempo de prateleira estipulado para o alimento tem de ser razoável e não ideal, pois deve-se deixar uma margem de segurança. Com o objetivo de diminuir a possibilidade de haver uma má manipulação do produto por parte do consumidor, deve-se especificar quais as condições de armazenamento do mesmo, ou então limitar a sua distribuição.</p>

Fonte: Adaptado de (NZFSA, 2005; Henriques, 2008; Galić, 2009; Pereira, 2014).

Tabela 1.7: Etapas do Método Direto para determinar o tempo de prateleira de um alimento. (Continuação)

Após comercialização do produto	
6. Monitorização do tempo de prateleira de um alimento.	<p>As amostras devem ser sempre estudadas nos parâmetros, que durante o estudo de vida útil, indicaram serem os mais relevantes como, por exemplo: a perda de sabor, a acidez, o nível/número de organismos deteriorados... Também se deve ter em conta quaisquer alterações no ambiente de processamento ou de produção, pois pode influenciar o prazo de vida útil do alimento. Por isso, os estudos de vida útil têm que ser repetidos de forma a garantir a qualidade e a segurança do produto.</p> <p>Outra forma de monitorizar o tempo de vida útil é retirar amostras de diversos pontos de retalho e distribuição. Se o teste demonstrar que o prazo de validade preliminar é inapropriado, então deve ocorrer o ajuste do mesmo. Para se conseguir obter um prazo de validade mais prolongado, deve-se, primeiramente, identificar quais os fatores que limitam o tempo de prateleira do alimento, para que, posteriormente, estes sejam modificados. No fim, deve-se repetir, novamente, o estudo do tempo de vida útil, de forma a conferir a qualidade e a segurança do produto.</p> <p>É importante haver uma monitorização regular ao prazo de vida útil dos alimentos, de forma a garantir que o produto alimentar se encontra seguro e com uma boa qualidade, ao longo do seu tempo de vida útil.</p>

Fonte: Adaptado de (NZFSA, 2005; Henriques, 2008; Galić, 2009; Pereira, 2014).

1.2.3.2) Métodos Indiretos

Estes métodos são utilizados em alimentos que possuem um prazo de validade mais longo. Com eles tenta-se prever o tempo de vida útil do produto alimentar sem usar ensaios de longa duração, isto porque o estudo não é efetuado num tempo de armazenamento completo. Os métodos indiretos mais usados são (NZFSA, 2005):

- **Testes de Aceleração de Vida Útil:** Estes testes têm como principal objetivo encurtar o tempo do período experimental, ao expor o alimento a condições ambientais que estimulam o aceleração das reações de deterioração, de forma a estimar o tempo de vida útil em condições normais de armazenamento. Este teste pode ser realizado mediante o aceleração de processos físicos, químicos, microbiológicos e bioquímicos do produto como, por exemplo, através do aumento da temperatura de armazenamento (NZFSA, 2005; Mizrahi, 2011). Este método, para além de ser utilizado em produtos com uma data de validade prolongada, também pode ser utilizado em alimentos perecíveis, nomeadamente em produtos à base de carne ou em produtos lácteos refrigerados (Corradini & Peleg, 2007);
- **Microbiologia Preditiva:** Este método é a combinação de modelos matemáticos (construídos com base em dados laboratoriais) com um *software* informático. O principal propósito deste método é prever através de um gráfico a resposta dos microrganismos em relação a fatores intrínsecos e extrínsecos. É usado de forma a estimar o prazo de validade, bem como a segurança alimentar. Também é útil na área do desenvolvimento de produtos,

pois permite determinar a estabilidade e segurança das novas formulações e saber quais podem fornecer o prazo de validade desejado. Este método é útil, igualmente, para perceber se uma alteração no processamento ou na formulação pode afetar o prazo de validade e a segurança em alimentos que tenham já um tempo de prateleira definido. Para os cálculos são necessárias todas as informações acerca das propriedades do alimento e da embalagem e sobre todas as mudanças que provocam a deterioração no produto. Apesar de a microbiologia preditiva conseguir diminuir a realização de testes microbiológicos de forma a determinar o tempo de vida útil do alimento, pode acontecer que, em alguns casos, essas previsões possam não ser fiáveis/exatas devido às respostas dos microrganismos não serem constantes e de haver alterações nos meios de crescimento. Por isso, estes modelos microbiológicos preditivos não determinam com precisão o crescimento, a sobrevivência e a inativação de microrganismos patogénicos nos alimentos (NZFSA, 2005; FSAI, 2019);

Para determinados tipos de microrganismos existem modelos microbiológicos preditivos próprios (NZFSA, 2005). Por exemplo, o software “ComBase Predictor” (*figura 1.4*) prevê a resposta de determinados microrganismos patogénicos e outros que provocam a deterioração no alimento em relação a determinados fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como a temperatura, o pH e o a_w (De Araújo et al., 2017). Existe outro modelo microbiológico preditivo que analisa a redução no número de microrganismos na superfície dos alimentos durante a fase de pasteurização. Este modelo designa-se por “BugDeath” (James & Evans, 2006).

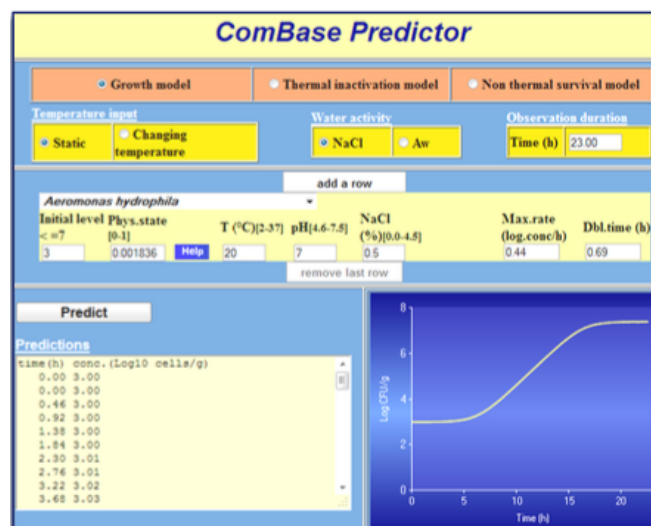


Figura 1.4: Imagem do software informático “ComBase Predictor”.

Fonte: Tavares, 2013.

- **Teste de desafio:** Determina se um agente patogénico presente no alimento se pode nele desenvolver/sobreviver, o que a acontecer permite saber qual é o seu potencial de crescimento. Este teste possibilita o estabelecimento e a validação da segurança do produto alimentar, nomeadamente, na sua formulação e nas condições de

armazenamento, ao longo do prazo de validade estabelecido (NZFSA, 2005; FSAI, 2019). Este teste é feito através da inoculação dos microrganismos mais importantes, realizando-se de seguida a incubação do produto em condições ambientais controladas, de forma a determinar a estabilidade do mesmo ou para ver se poderá existir algum risco de intoxicação alimentar (NZFSA, 2005);

- **Teste de Durabilidade:** Tem como principal objetivo obter o crescimento de microrganismos nos produtos alimentares fabricados sob condições razoavelmente espectáveis de distribuição, armazenamento e de utilização (FSAI, 2019).

1.2.4) Indicadores de Avaliação da Vida Útil de um Alimento

Como já foi referido anteriormente neste capítulo, o término do tempo de vida útil de um alimento é ditado pelas mudanças físico-químicas, microbiológicas e organoléticas (Moschopoulou et al., 2019), pelo que, é importante fazer uma monitorização a nível de todas estas características, durante o tempo de armazenamento de um determinado alimento, de forma a saber até que ponto é possível garantir a sua segurança e até que altura é exequível manter a sua qualidade (Granato et al., 2010; Giménez et al., 2012). A cor, textura, pH, atividade da água, análise da composição química (teor em proteína, açúcar, gordura, proteína) e análise microbiológica constituem exemplos de alguns parâmetros necessários para se fazer uma avaliação, em termos de qualidade, estabilidade e de segurança, num produto alimentar (Kilcast & Subramaniam, 2000).

1.2.4.1) Análise Sensorial

Para os consumidores de hoje, a principal consideração para selecionar um produto alimentício é a sua qualidade organolética, para além de outros parâmetros, como a nutrição e a salubridade. Assim sendo, a indústria alimentar deve garantir que a qualidade dos alimentos seja atraente e apetecível para os consumidores, de forma a que estes ambicionem por mais (Singh-Ackbarali & Maharaj, 2014). Assim, a análise sensorial tornou-se uma necessidade para os setores industriais, principalmente no desenvolvimento de novos produtos, e um bom método para comprovar a qualidade de um alimento (De Noronha, 2006; Singh-Ackbarali & Maharaj, 2014; Aceña et al., 2017).

Segundo a Norma Portuguesa 4263, de 1994, a análise sensorial é definida como o “exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos” (De Noronha, 2006; p. 1). Atualmente, a análise sensorial pode ser definida como “um método científico usado para evocar, medir, analisar e interpretar a resposta a produtos pela perceção obtida pelos órgãos dos sentidos (visão, olfato, tato, paladar e audição)” (Yang & Lee, 2019; p.1).

Na avaliação sensorial são avaliadas características como aparência, cor, aroma, consistência ou sabor. Existem cinco tipos de sabores primários: o azedo, o salgado, o doce, o umami e o amargo que

são sentidos através dos recetores existentes na língua (**figura 1.5**) (Francis et al., 2012). Já o aroma é detetado através do sentido do olfato.



Figura 1.5: Os cinco sabores básicos detetados pelas papilas gustativas.

Fonte: <https://www.infoescola.com/paladar/papilas-gustativas/>

A análise sensorial constitui, assim, uma forma de determinar se as diferenças do produto são perceptíveis, qual a base para essas diferenças e se um produto é mais apreciado do que outro (Stone, 2018). Para a maioria dos testes sensoriais, é necessário um painel sensorial humano que deve ser tratado como um instrumento científico, isto é, os membros do painel devem ser selecionados, calibrados e validados, sendo ainda solicitados a ter um nível razoável de percepção sensorial, comprometimento e motivação (Singh-Ackbarali & Maharaj, 2014; Aceña et al. 2017). Além disso, para que se obtenham resultados confiáveis na análise sensorial, para além do painel de avaliadores treinado, são necessárias ferramentas estatísticas adequadas para interpretar as suas avaliações, protocolos de análise precisos, vocabulário sensorial comum e salas de teste padronizadas. É importante salientar que a análise obtida pelo painel deve ser devidamente avaliada, tendo em conta que a análise sensorial pode variar entre os diversos membros, uma vez que os indivíduos têm diferentes sensibilidades, preferências e conhecimentos do produto, o que faz esta análise ser mais subjetiva do que objetiva. Inclusivamente, deve ter-se em conta que existem fatores fisiológicos que podem variar ao longo do tempo em cada pessoa, tais como a fadiga, *stress*, estado de saúde, entre outros. Para além destas desvantagens relacionadas com a subjetividade dos membros do painel e com a variabilidade de respostas ao longo do tempo, existem ainda outros problemas, entre os quais o custo e o tempo (tanto no treinamento do painel, como na realização dos testes sensoriais) (Singham et al., 2015; Aceña et al., 2017).

A principal preocupação numa análise sensorial é garantir que o método de teste é apropriado para responder às perguntas feitas sobre o produto. Por esse motivo, os métodos são classificados de acordo com a sua principal finalidade, sendo os testes de diferença/discriminativos, testes descritivos e testes afetivos (preferência/aceitação), os testes sensoriais mais comumente aplicados. Os primeiros dois testes pertencem à categoria dos analíticos, enquanto o último pertence à categoria dos hedónicos (Lawless & Heymann, 2010).

Os testes de diferença/discriminativos estimam a magnitude das diferenças sensoriais entre as amostras e incluem o - *triangle test* – onde cada membro do painel tenta detetar qual das três amostras é diferente das outras duas e o - *duo-trio test* – em que cada membro do painel seleciona qual das duas amostras é diferente do padrão identificado (Singh-Ackbarali & Maharaj, 2014). Por outro lado, os testes

descritivos procuram identificar e quantificar a intensidade das características sensoriais do produto, onde estão incluídos os métodos: Perfil de *flavour* (*Flavour Profile*); QDA; Perfil de Textura (*Texture Profile*); Perfil Flash; Método Spectrum e Perfil de livre escolha (De Noronha, 2006; Vaclavik & Christian, 2008). Por seu lado, os testes afetivos (preferência/aceitação) são utilizados para estabelecer a aceitação ou preferência do consumidor, procurando quantificar o quanto estes gostam ou não de um determinado produto. Este último inclui os *ranking test*, em que os participantes recebem duas ou mais amostras e são solicitados a classificá-las em ordem de preferência, e os *likeability test*, em que os membros do painel são convidados a provar uma amostra e classificá-la numa escala hedónica de nove pontos, onde também podem ser solicitados a testar mais do que uma amostra, pontuando-as na mesma escala e, por fim, descrever as diferenças entre elas, o que fornece resultados válidos e fiáveis (Curia et al., 2001; Vaclavik & Christian, 2008; Hough, 2010). Os testes acima referidos podem requerer ou não que os participantes sejam treinados (Lawless & Heymann, 2010).

Em estudos em que se estimam prazos de validade a um determinado alimento é importante avaliar os atributos que conferem qualidade ao produto, nomeadamente: sabor, textura, cheiro e aparência ao longo do tempo de armazenamento e saber se esses mesmos atributos conseguem manter-se estáveis/aceitáveis durante o período de vida útil desse produto alimentar (Hough, 2010). As avaliações devem ser feitas nas condições normais de armazenamento e de consumo (NZFSA, 2005). É possível definir um limite de aceitação sensorial de um produto e considerar que o prazo de validade não pode ser estendido para além desses limites. Por exemplo, Curia et al. (2005) avaliaram o tempo de prateleira do leite de soja adicionado ao leite de búfala através de análises sensoriais e estabeleceram que o prazo de validade deste produto iria até à pontuação média do sabor ser inferior a seis, numa escala hedónica de nove pontos.

1.2.4.2) Avaliação Físico-Química

As mudanças físico-químicas que ocorrem no alimento, ao longo do seu tempo de vida útil, podem provocar alterações na qualidade e na segurança do produto alimentar. Estas alterações podem levar à deterioração do alimento e, assim, provocar a redução do seu tempo de prateleira.

As principais alterações físico-químicas que ocorrem nos alimentos estão relacionadas com as reações de oxidação, nomeadamente a oxidação lipídica, e com outras reações enzimáticas e não enzimáticas que levam à deterioração do produto (Singh & Cadwallader, 2004; Moschopoulou et al., 2019).

Análises físico-químicas a determinados parâmetros - como, por exemplo, pH; cor, textura, a análise a produtos específicos das reações de deterioração de um determinado alimento como, por exemplo, determinação dos ácidos gordos livres, azoto básico volátil, produtos da peroxidação lipídica, etc., podem ser utilizadas para detetar se existem mudanças na qualidade ao longo do tempo de vida útil e estimar o prazo de validade de cada alimento (NZFSA, 2005; Akoy et al., 2008; Liu et al., 2019; Oliveira et al., 2019).

A cor de um alimento é uma das principais características que o consumidor tem em conta na hora de compra, sendo por isso um dos parâmetros decisivos para a escolha/aceitabilidade de um determinado produto. Existem dois aspetos que os consumidores têm em conta na avaliação da cor de um alimento (Calvo & Salvador, 2000; Patras, 2018):

- **Luminosidade:** Com base na quantidade de luz emitida, é a percepção que distingue a mesma tonalidade;
- **Tonalidade:** É a percepção que permite ao consumidor distinguir cores diferentes como, por exemplo, o vermelho do amarelo ou o verde do azul.

Através de métodos quantitativos, calculam-se as coordenadas do sistema de escala de Hunter (L^* , a^* e b^*). Estes parâmetros quantitativos pretendem realçar a cor perceptível pelo olho humano, visto que a cor detetada por este é um parâmetro sensorial mais subjetivo. Assim, com este sistema (*figura 1.6*) é possível descrever a localização precisa da cor num espaço de cores tridimensionais. Na escala de Hunter, o intervalo de valores de cada parâmetro é a seguinte (Wojdyło et al., 2009; Rebelo, 2017):

- **L^* (Luminosidade):** Varia entre 0 (preto) e 100 (branco);
- **a^* (coordenada vermelho/verde):** Varia entre verde (valores negativos ($-a^*$)) e vermelho (valores positivos ($+a^*$));
- **b^* (coordenada amarelo/azul):** Varia entre azul (valores negativos ($-b^*$)) e amarelo (valores positivos ($+b^*$)).

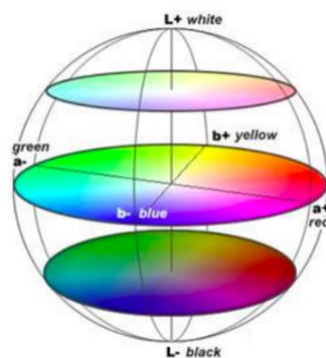


Figura 1.6: Sistema de cor L^* , a^* e b^* tridimensional e a duas dimensões com luminosidade fixa.
Fonte: Correia, 2018.

As variações de cada coordenada ($L - L^*$, $a - a^*$ e $b - b^*$) numa dada altura do tempo de armazenamento em relação com as determinadas no tempo inicial (T_0), permitem calcular a mudança de cor (ΔE) que ocorreu durante o tempo de armazenamento num determinado espaço de tempo; bem como o valor do **Ângulo de Hue**, que determina a tonalidade da cor (0° – Vermelho; 90° – Amarelo, 180° – Verde; 270° – Azul) (Konica Minolta, b) 2020) e, por último, as coordenadas **Chroma (C^*)** essenciais para a avaliação da qualidade do alimento, sendo que quanto maior for o seu valor, mais forte e brilhante é a cor (Mohammadi et al., 2008; Wojdyło et al., 2009; Rebelo, 2017).

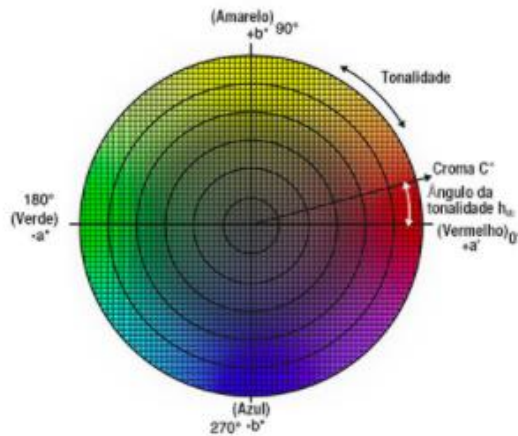


Figura 1.7: Sistema de cor a^* e b^* , Ângulo de Hue e Chroma (C^*) com luminosidade fixa.
 Fonte: Konica Minolta, b) 2020.

A textura de um alimento pode ser definida como: “todos os atributos mecânicos, geométricos e de superfície de um produto perceptíveis por meio de recetores mecânicos, táteis e, quando apropriado, visuais e auditivos” (ISO 5492:1992).

A variação da textura é um dos parâmetros físicos mais avaliados num alimento. Essas variações podem resultar da ação das reações químicas que acontecem no produto alimentar provocadas, designadamente, pela influência das condições ambientais ou dos ingredientes ou pela migração de humidade através da embalagem. Os métodos a serem utilizados para estudar este parâmetro devem ser bem escolhidos, de forma a que as alterações na textura detetadas por um painel de provadores durante uma análise sensorial se correlacionem com os resultados obtidos pelos métodos analíticos (Kilcast & Subramaniam, 2000). Para isso, existem três tipos de testes que servem para que se proceda à análise instrumental da textura que são os testes empíricos, os imitativos e os fundamentais. Os primeiros medem algo físico em condições bem estipuladas; os segundos testes pretendem simular as condições em que o material se encontra na boca; e por fim, os fundamentais definem as propriedades físicas como, por exemplo a viscosidade e a elasticidade (Rosenthal, 1999).

O método mais usado para estudar a textura num alimento designa-se por *Texture Profile Analysis* (TPA). Esta análise permite obter resultados fiáveis e rápidos relativamente à textura e que também se correlacionam com os resultados sensoriais obtidos numa análise sensorial (Choe et al., 2015; Cando, 2016).

1.2.4.3) Avaliação Microbiológica

A avaliação microbiológica dos alimentos constitui um ponto-chave na determinação do seu tempo de vida útil, dado o impacto que a contaminação microbiológica pode ter na sua segurança e na manutenção dos seus atributos de qualidade. No caso dos produtos prontos a consumir, esta avaliação assume uma importância ainda mais elevada, dado que estes produtos alimentares não sofrem qualquer tratamento térmico antes de serem consumidos (Fang et al., 2003).

Existem dois aspetos que devem ser considerados aquando da determinação da estabilidade microbiológica de um alimento: o desenvolvimento de microrganismos que levem à sua deterioração e o crescimento de microrganismos patogénicos que podem afetar a segurança do produto alimentar (Kilcast & Subramaniam, 2000; NZFSA, 2005).

Os microrganismos podem ser transportados através da água, plantas, animais, dos humanos e do vento. Deste modo, podem-se encontrar, desde o início, em animais ou vegetais e em matérias-primas que depois vão ser utilizadas na produção de alimentos ou, então, podem ser introduzidas pelas vias já mencionadas anteriormente. No caso de se encontrarem presentes nos alimentos, estas conseguem desenvolver-se quando houver condições mínimas que estimulem o seu desenvolvimento. Para além das condições mínimas de crescimento, a manipulação e o armazenamento inadequado dos alimentos são outros fatores que podem induzir o crescimento microbiológico (Baptista & Venâncio, 2003; Alfen, 2014).

O crescimento de microrganismos patogénicos que causam intoxicações alimentares, como é o caso da *Listeria monocytogenes* e da *Salmonella* spp., não é necessariamente acompanhado por alterações na textura, cheiro, sabor e aparência dos alimentos, pelo que se torna difícil detetá-las através dos sentidos do ser humano, o que implica uma preocupação com a sua saúde. No caso dos microrganismos de deterioração, através da ação das suas enzimas, estes podem ser detetados pelas alterações sensoriais, nomeadamente o aparecimento de sabores e de odores desagradáveis, o crescimento de fungos visíveis e de mudanças na textura (Kilcast & Subramaniam, 2000).

De forma a determinar o tempo de vida útil de um alimento, é necessário armazenar o produto alimentar a uma temperatura adequada e medir a sua carga microbiana em intervalos pré-estabelecidos até chegar a um nível pré-determinado de contagem microbiana (contagem total e microrganismos individuais), que é considerado como o ponto final. É necessário deixar uma margem de segurança do tempo de vida útil que é considerado como o ponto final (Kilcast & Subramaniam, 2000).

A contagem microbiana pode ser feita através da realização de métodos diretos e indiretos (Guerra, 2016). Os métodos diretos consistem na contagem em placas. Baseiam-se na capacidade de os microrganismos conseguirem reproduzir-se num determinado meio de cultura e numa temperatura ótima de crescimento. O ajuntamento de bactérias num único *loco* da placa torna possível a visualização de uma colónia a olho nu. O resultado, posteriormente, é expresso em UFC (unidade formadora de colónia) por unidade (área, volume ou peso). Nos métodos indiretos existem outras técnicas que são utilizadas para a contagem microbiana, nomeadamente, a técnica dos tubos múltiplos. A técnica dos tubos múltiplos é uma técnica estatística de contagem microbiana. É expressa por “número mais provável de unidade formadora de colónia por grama ou mililitro” (NMP/ml ou g) (Guerra, 2016).

Para avaliar a contagem microbiana num dado alimento seguem-se critérios microbiológicos, em que se analisam microrganismos indicadores de higiene ou de alteração e os microrganismos patogénicos (indicadores de segurança). Os microrganismos de higiene ou de alteração que são mais analisados nos alimentos são os microrganismos aeróbios totais a 30°C, os bolores e leveduras a 25°C, as bactérias ácido-láticas (BAL), as *Enterobacteriaceae* a 37°C, a *Escherichia coli* e a *Listeria* spp. Por sua vez, as bactérias patogénicas normalmente pesquisados são o *Bacillus cereus*, *Clostridium*

perfringens, Estafilococos coagulase positiva, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., a *Cronobacter* spp., *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC), outras estirpes de *Escherichia coli* patogénicas, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Yersinia enterocolitica* (Saraiva et al., 2019).

1.3) Aditivos

No regulamento (UE) Nº1129/2011 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 humectantes, agentes espumantes e fermentos químicos;
- **Aditivos que conservam os alimentos:** Conservantes, antioxidantes, acidulantes e reguladores de acidez;
- **Aditivos capazes de alterar as propriedades organolépticas dos alimentos:** Corantes, edulcorantes, aromatizantes, potenciadores de sabor e estabilizantes da cor.

1.4) Sobremesas Lácteas

As sobremesas lácteas são classificadas como sobremesas prontas para consumo, que são alimentos preparados, pré-cozidos ou cozidos, aos quais não é necessário adicionar qualquer ingrediente ou realizar algum cozimento/aquecimento adicional para o seu consumo (Sanches, 2018).

Ao longo das décadas, as sobremesas lácteas prontas para consumo têm vindo a ser crescentemente procuradas pelos consumidores (Nikaedo et al., 2004). Os consumidores procuram muito estes alimentos, porque são influenciados pelas características sensoriais e nutricionais que eles

apresentam. Atualmente, existe uma vastidão de sobremesas à base de leite prontas a consumir, com novos sabores e com maior valor nutritivo e digestibilidade e que se encontram disponíveis para os consumidores (Buriti & Saad, 2013; Duarte et al., 2019).

Segundo o *Codex Alimentarius*, a categoria de sobremesas lácteas inclui as que são aromatizadas e as misturas para sobremesas, tais como a mousse de chocolate, os pudins, os iogurtes, os gelados e o doce de leite (o leite é cozido e depois é-lhe adicionado açúcar e outros ingredientes como, por exemplo, chocolate e coco) (*Codex Alimentarius* STAN 192 - 1995).

1.4.1) Pudins & Cremosos

Os pudins são alimentos com uma textura semi-sólida e são formados, normalmente, por pastas de amido e por proteínas do leite. Ou seja, podem ser considerados como uma suspensão de partículas deformáveis (grânulos de amido inchados) e que se encontram dispersas num meio contínuo, onde existem as proteínas do leite e o agente gelificante, nomeadamente, a carragenina. Atualmente encontram-se no mercado pudins prontos para consumo. As misturas de pudins instantâneos são dissolvidas em leite ou água, ficando os pudins preparados num curto espaço de tempo. Normalmente, a formulação do pudim comercial contém: hidrocolóides, amido, corantes, aromas e açúcares. Contudo, em cada pudim, estes ingredientes podem variar na quantidade, consoante o produto final (Alamprese & Mariotti, 2011; Sadat et al., 2017). As etapas de preparação de um pudim envolvem uma etapa de aquecimento, e de seguida, uma etapa de arrefecimento, para que se consiga alcançar a estrutura do gel desejada (Sadat et al., 2017).

Os cremosos prontos para consumo são sobremesas lácteas que têm vindo a tornar-se mais populares em todas as faixas etárias, especialmente, nas crianças. Este tipo de sobremesa pretende ser uma alternativa às sobremesas clássicas e existem no mercado com diferentes sabores, características tecnológicas e texturas (Da Silva & Sa, 2020; Sanches, 2018). Os avanços tecnológicos que têm vindo a ocorrer, permitiram que os cremosos passassem a ter uma maior flexibilidade em termos de composição, existindo uma maior possibilidade de adicionar ingredientes funcionais e inovadores e que tenham um maior tempo de vida de prateleira. Graças a estas inovações, é possível haver cremosos de diferentes sabores e com um valor nutritivo agregado (Sanches, 2018).

1.4.2) Ingredientes Comuns na Formulação de Sobremesas Lácteas

Água, leite em pó, amido, aromas, sal, edulcorantes (sucralose, acesulfame-K), chocolate, cacau, carragenina, goma de farinha de alfarroba, goma xantana, açúcar, nata, farinha de aveia e corantes (betacaroteno, carminas, caramelo e curcumina) são alguns ingredientes que podem ser utilizados na formulação de sobremesas lácteas.

1.4.2.1) Água

A água é usada como ingrediente em muitos alimentos, devendo garantir-se a sua potabilidade. Para tal, a água para ser usada nas indústrias têm cumprir com os parâmetros de qualidade físico-química e microbiológica de uma água para consumo humano (Decreto-Lei 152/2017) de modo a garantir a sua inocuidade para os consumidores. Para além de ser utilizada como ingrediente, a água é também necessária na limpeza de equipamentos e sistemas de refrigeração e de geração de vapor. Para tal, a água para ser usada nas indústrias deve cumprir certos parâmetros de qualidade físico-química e microbiológica, de forma a evitar não só a alteração na qualidade dos géneros alimentícios mas também a deterioração de equipamentos (Simensato & Bueno, 2019).

1.4.2.2) Leite em pó

O leite é um alimento de elevado valor nutricional que apresenta quantidades relevantes de vitaminas, particularmente a B12 e a D, e minerais, dos quais se destacam o especialmente cálcio mas também o fósforo. A composição do leite inclui ainda proteínas de elevado valor biológico, e lactose (açúcar) (Associação Portuguesa dos Nutricionistas, 2016; Marangoni et al., 2018; Dos Santos et al., 2019).

O leite pode ser classificado segundo o tratamento térmico aplicado e, também, pelo seu teor em matéria gorda. Segundo o tratamento térmico, o leite pode ser classificado em leite cru (se não tiver sido aquecido acima dos 40°C), leite pasteurizado (aquecido a temperaturas não muito elevadas durante pouco tempo e rapidamente arrefecido), leite esterilizado (aquecido a temperaturas muito elevadas durante um longo período de tempo na embalagem final) e leite UHT (aquecido a temperaturas elevadas durante muito pouco tempo, e arrefecido até 20°C. De acordo com o teor de matéria gorda, o leite é classificado como gordo (teor mínimo de gordura de 3,5%), meio gordo (teor de gordura entre 1,5% - 1,8%) e magro (teor máximo de gordura de 0,5%). O leite magro é pobre em vitaminas associadas ao mesmo, como é o caso da vitamina D (Associação Portuguesa dos Nutricionistas, 2016; Marangoni et al., 2018; Dos Santos et al., 2019).

O leite em pó é obtido por desidratação do leite de vaca inteiro (gordo), desnatado (magro) ou parcialmente desnatado (meio gordo), sendo apto para a alimentação humana mediante processos tecnologicamente adequados. O teor de gordura do leite em pó depende da quantidade de gordura presente no leite líquido usado na sua produção (Figueiredo et al., 2001; Moutinho et al., 2011).

O leite em pó contribui para que o alimento tenha um maior tempo de prateleira e uma diminuição no teor de humidade, e é utilizado nas indústrias alimentares, porque aumenta o valor nutritivo e influencia a viscosidade e a textura dos alimentos (Richter & Lannes, 2007). Caso o leite seja substituído por outros meios de dispersão, isso pode causar mudanças drásticas no comportamento reológico dos pudins, devido às interações complexas entre os componentes desta sobremesa láctea (Alamprese & Mariotti, 2011).

1.4.2.3) Amido

O amido é um polímero natural, sendo constituído por várias moléculas de glucose, que podem agrupar-se em estruturas lineares (amilose) ou mais ramificadas (amilopectina). Em amidos nativos as moléculas de amilose, amilopectina e quantidades limitadas de água são organizadas em micelas dentro de uma estrutura microscópica, morfologicamente identificável, chamada de grânulo. A utilização do amido baseia-se na disrupção da estrutura ordenada dos grânulos (gelatinização) que ocorre após o cozimento e que confere uma alta viscosidade.

O amido presente nas formulações dos pudins desempenha um papel fundamental nas suas propriedades reológicas, corpo e na sensação que se 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 resultando num aumento da viscosidade. A presença de cadeias de gordura contribui para o aumento da viscosidade destas pastas à base de amido (Alamprese & Mariotti, 2011; Ares et al., 2012).

1.4.2.4) Sal

O sal mais utilizado na indústria alimentar é o cloreto de sódio (NaCl), uma das suas funções é melhorar a textura e o sabor dos alimentos. Também é utilizado em processos de cura e de salga de forma a reduzir a água livre e, conseqüentemente, impedir o crescimento microbiano e mascarar os sabores desagradáveis e metálicos (Lazic et al., 2015; Elias et al., 2019; Oliveira et al., 2019).

1.4.2.5) Chocolate, Chocolate Branco & Cacau

O chocolate é proveniente dos grãos do cacau *Theobroma cacao*. Após a recolha dos grãos/amêndoas, estes são fermentados e formam o cacau (maior ingrediente do chocolate) (Katz et al., 2011). Nos grãos de cacau, não existe naturalmente o aroma de chocolate. O processo de fermentação pós-colheita dos grãos e a subsequente torrefação é que vão permitir a formação dos compostos aromáticos característicos do chocolate (De Souza, 2017). Para além da formação de precursores de aroma, durante a fermentação, ocorre ainda o desenvolvimento da cor e, também, uma redução na amargura (Afoakwa et al., 2008).

O chocolate é um alimento sólido à temperatura ambiente, sendo formado maioritariamente por manteiga de cacau, licor de cacau e açúcar. No produto final, a quantidade existente de licor de cacau é que vai determinar o quão escuro é que vai ser o chocolate (Katz et al., 2011). Depois de finalizada a produção do chocolate, este pode ser apresentado em vários formatos e, ainda, podem ser adicionados recheios e coberturas (Richter & Lannes, 2007; Luccas et al., 2014). O chocolate derrete-se facilmente à temperatura do corpo e liberta aromas e sabores que vão ser somadas à sua doçura,

o que vai facilitar a aceitabilidade deste produto alimentar por parte dos consumidores (Luccas et al., 2014).

O chocolate branco é composto por manteiga de cacau acompanhada por adoçantes e componentes lácteos (Katz et al., 2011). Este tipo de chocolate deve ter de matéria seca um valor mínimo de 20% de manteiga de cacau, 14% de sólidos de leite e um mínimo de gordura de leite entre os 2,5 e os 3,5%. Em determinados casos, são exigidos valores mínimos de gordura de leite e de manteiga de cacau pelas autoridades competentes (*Codex Alimentarius*, 2016).

O cacau em pó é a “parte sólida obtida a partir da prensagem hidráulica da pasta de cacau, denominada torta, que é moída e arrefecida a temperatura controlada” (Richter & Lannes, 2007; p.361). As partes mais importantes deste componente são a finura e a cor. A cor varia ao longo do tempo, devido ao processo de alcalinização (que serve para aumentar a solubilidade) e a finura é controlada através de peneiras que são usadas nos moinhos. Nas formulações de recheio, este componente contribui para a cor, a textura e o sabor, mas também para a redução da atividade de água, estimulando, assim, um aumento do tempo de prateleira do produto alimentar. A coloração do produto final dá expectativas relativas ao paladar, pelo que o tipo e a quantidade de cacau em pó utilizado podem afetar a qualidade final do chocolate. Ou seja, o tipo de cacau usado e as misturas que foram realizadas com diferentes variedades de cacau conseguem definir qual a especialidade para cada tipo de chocolate produzido (Richter & Lannes, 2007).

1.4.2.6) Açúcar

A sacarose ou açúcar comum é obtida industrialmente a partir da cana-de-açúcar ou da beterraba sacarina. 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). O açúcar é responsável pelo corpo e sabor doce dos produtos alimentares (Richter & Lannes, 2007). O açúcar é facilmente metabolizado e absorvido (Alija & Talens, 2012).

A redução de açúcar nos alimentos, é uma medida preventiva, de forma a evitar a obesidade e doenças relacionadas com o estilo de vida (Bertelsen et al., 2020).

1.4.2.7) Nata

A nata (líquida ou em pó) obtém-se por separação da matéria gorda do leite. A nata em pó é um produto seco e pulverizado, que se obtém por desidratação da nata líquida pasteurizada (Lidon, et al. 2007). Tem cor branca, uma textura uniforme e firme e possui um odor e sabor característicos (Albino, 2018; Shinohara et al., 2019). Para além da sua utilização em sobremesas, a nata pode ser utilizada na produção de manteiga, preparação de molhos e em produtos de confeitaria (Shinohara et al., 2019).

1.4.2.8) Farinha de Aveia

A farinha de aveia tem inúmeros benefícios para a saúde, pois é composta por um alto teor em antioxidantes. É uma grande fonte de vitaminas do grupo B, hidratos de carbono complexos, ácidos gordos ômega-6, fibra hidrossolúvel e alguns minerais como, por exemplo, potássio, magnésio, zinco e cobre. Ao ter uma fibra hidrossolúvel, é eficiente em reduzir o colesterol e evitar doenças cardiovasculares. Ao ser rico em fibra, dá uma “sensação precoce de saciedade” (Sánchez, 2018).

1.4.2.9) Hidrocolóides - Carragenina/Carragenano

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 polissacáridos 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 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 & Nie, 2016; Saunders, 2016; Benjakul et al., 2018; Kamal et al., 2018).

A carragenina (E407) é produzida pelas algas vermelhas, principalmente, das espécies *Gigartina stellata*, *Chondrus crispus*, *Rhodophyceae*, *Iridaea* e *Hypnea*, entre outras. Estas algas produzem carragenina como componente principal da sua parede celular. Este componente possui uma cadeia D-galactose, que se encontra ligada sob ligações glicosídicas alternadas de α -1,3 e β -1,4. Esta substância é uma mistura complexa de polissacáridos lineares portadores de grupo sulfato sob a forma de sais de magnésio e cálcio (ASAEa, 2020; Campo et al., 2009; Necas & Bartosikova, 2013; Prajapati et al., 2014). Existem diversos tipos de carragenina, nomeadamente, a k (kappa), a i (iota), a λ (lambda), a μ (mu), a θ (theta), a ξ (ksi) e a ν (nu) (**figura 1.8**), sendo que as principais são a kappa (k), a lambda (λ) e a iota (i). Os diferentes tipos diferenciam-se na quantidade e na posição dos grupos de éster de sulfato, bem como no conteúdo em 3,6-anidrogactose (Necas & Bartosikova, 2013; Prajapati et al., 2014).

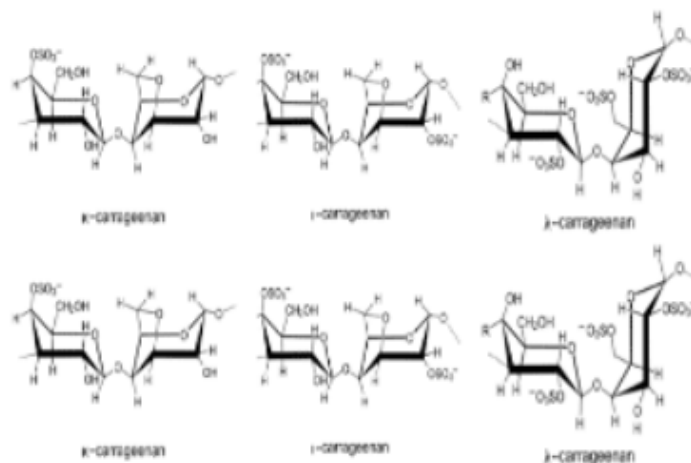


Figura 1.8: Estruturas químicas das carrageninas: k, i, λ, θ, v e μ.
 Fonte: Necas & Bartosikova, 2013.

A carragenina é instável nas condições de temperatura elevada e baixo pH baixo, pelo que pode ser despolimerizada por ação de uma hidrólise catalisada por um ácido (Necas & Bartosikova, 2013).

Esta substância é utilizada como gelificante, espessante e emulsionante (ASAEa, 2020) nos queijos cottage para melhorar a textura, nos pudins e em outras sobremesas lácteas, por forma a controlar a textura e a viscosidade, e na indústria de carnes, nomeadamente, na fabricação de salsichas, empadas e hambúrgueres com pouca gordura. Para além da indústria alimentar, a carragenina é usada na indústria farmacêutica, impressão e cosmética (Campo et al., 2009). Nas sobremesas lácteas, nomeadamente, em pudins, iogurtes e gelados, ocorrem interações entre as micelas de caseína do leite e as cadeias da carragenina (Langendorff et al., 1997).

Segundo o Regulamento (UE) n.º 1129/2011 de 11 de novembro, na maioria dos produtos alimentares, este componente pode ser usado em quantidades *quantum satis*.

1.4.2.10) Goma de farinha de alfarroba

As gomas são muito utilizadas nas indústrias alimentares, para darem a textura necessária e para evitarem que haja o fenómeno de sinérese nos alimentos. No momento da escolha do tipo de goma que deve ser utilizada, deve ter-se em conta a viscosidade e textura desejada, o pH do sistema, a temperatura de processamento, as interações com os outros ingredientes e o custo e a quantidade necessária para se obter as características organoléticas pretendidas. Para além destes fatores, deve-se saber qual a capacidade da goma em atuar como ligante, espessante, inibidor de cristalização e de sinérese, agente de corpo e de volume e estabilizador de emulsão (Sanches, 2018).

A goma de farinha de alfarroba (E410) é um polissacárido do tipo galactomanana, que tem a capacidade de ser estabilizante, gelificante e emulsionante (ASAEa, s. d.). Esta goma ao funcionar sinergicamente com a carragenina, com o agar ou com a goma xantana, vai fazer com que haja formação ou alteração nas funções dos géis. Se a goma de farinha de alfarroba e a goma xantana trabalhassem isoladamente, elas não teriam a capacidade de gelificar, logo só possuíam a função de

espessar. Mas, quando trabalham em conjunto e em determinadas concentrações, produzem géis com atributos muito específicos como, por exemplo, géis elásticos. Este ingrediente provém das sementes do fruto da alfarrobeira (Inspiring Ingredients, 2020).

Segundo o Regulamento (UE) n.º 1129/2011 de 11 de novembro, na maioria dos produtos alimentares, este componente pode ser usado em quantidades *quantum satis*.

Esta goma é muito utilizada em laticínios, sumos, refrigerantes, comida pré-cozinhada, pastelaria, pão, conservas de frutos e em pudins. A goma de farinha de alfarroba não é absorvida nem degradada pelas bactérias do intestino humano, porque apresenta uma fraca digestibilidade e um valor energético baixo. Assim, comporta-se como uma fibra alimentar, segundo o ponto de vista nutricional (Inspiring Ingredients, 2020).

1.4.2.11) Goma Xantana

A goma xantana (E415) é um polissacárido de elevada massa molecular, produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* ao fermentar hidratos de carbono, sendo posteriormente purificada por extração com propano-2-ol e etanol e, finalmente, moída. É formada pelas hexoses D-glucose e D-manose e também pelos ácidos pirúvicos e D-glucurónico, sendo preparada sob a forma de sal de potássio, de sódio ou de cálcio (**figura 1.9**) (ASAEb, 2020; Moorhouse et al., 1977; Regulamento (UE) n.º 231/2012).

Segundo o Regulamento (UE) n.º 1129/2011 de 11 de novembro, na maioria dos produtos alimentares, este componente pode ser usado em quantidades *quantum satis*. A goma xantana é frequentemente usada como espessante, estabilizante e emulsionante. Não tem efeitos adversos para o organismo humano (ASAEa, 2020).

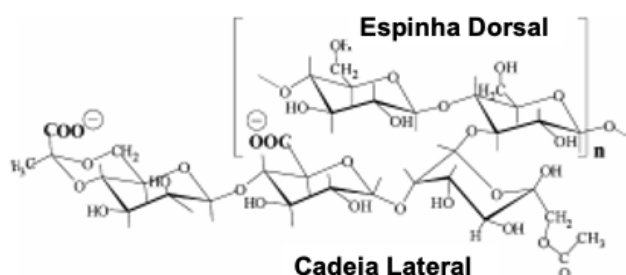


Figura 1.9: Estrutura química da goma xantana com as cadeias laterais alinhadas com a espinha dorsal.
Fonte: Adaptado de (Shchipunov et al., 2010).

1.4.2.12) Aromas/Aromatizantes

Os aromatizantes são substâncias que realçam ou intensificam o sabor e o odor dos alimentos. Estas substâncias são necessárias porque os alimentos perdem parte do seu aroma durante o processo

de fabrico e armazenamento, mas também são utilizadas para conferir um determinado sabor ao produto alimentar (Lidon & Silvestre, 2007).

O Regulamento (CE) n.º 1334/2008 faz referência aos aromas e a determinados ingredientes alimentares com propriedades aromatizantes utilizados nos e sobre os géneros alimentícios. Na Diretiva n.º 88/388/CEE podem distinguir-se as seguintes definições: aroma, substância aromatizante (natural, idêntica à natural e artificial), aroma de fumo, aroma de transformação e preparado aromatizante (Lidon & Silvestre, 2007).

1.4.2.13) Corantes

Os corantes são substâncias que intensificam, conferem, restauram a cor ou alteram a coloração de um produto alimentar, com o objetivo de melhorar as suas características físicas. Podem ser classificados em corantes orgânicos naturais ou em corantes orgânicos artificiais. Os primeiros são preparados com pigmentos isolados de origem animal ou vegetal. Os segundos podem ser adquiridos por “meio de síntese orgânica” (De Souza et al., 2019; p.9), através de processos tecnológicos, e podem ser subdivididos em corantes orgânicos sintéticos artificiais, que não possuem semelhanças com os produtos naturais, ou em corantes orgânicos sintéticos artificiais, que são idênticos aos naturais (Leichtweis et al., 2018; De Souza et al., 2019).

O betacaroteno (**figura 1.10**) é um corante alimentar natural (E160a) é um pigmento/carotenoide amarelo-alaranjado proveniente de plantas e encontra-se presente nas folhas em associação com as clorofilas e outros pigmentos, mas também em alimentos, tais como cenouras, laranjas, frutos de roseira, tomates, alperces e em outros produtos de origem vegetal.

O uso deste aditivo não tem efeitos adversos para o Homem. O betacaroteno é um precursor da vitamina A, com elevada capacidade antioxidante, pelo que pode ajudar a prevenir as lesões provocados pelos radicais livres (ASAEC, 2020; Aditivos & Ingredientes, 2020; Priyadarshani & Rath, 2012; Lakshmi, 2014).

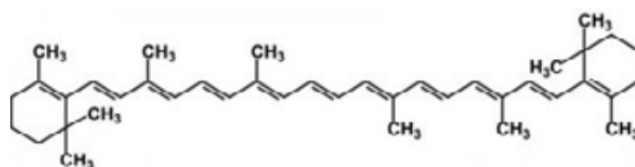


Figura 1.10: Fórmula Química do corante Betacaroteno.
Fonte: Aditivos & Ingredientes, 2020.

Este corante pode ser utilizado na generalidade dos produtos alimentares, nomeadamente sobremesas, produtos de padaria e pastelaria fina (Lidon & Silvestre, 2007). Segundo o Regulamento (UE) n.º 1129/2011 de 11 de novembro, na maioria dos produtos alimentares, este componente pode ser usado em quantidades *quantum satis*.

O corante de curcumina (E100) (**figura 1.11**) é obtido a partir do rizomada planta *Curcuma longa* L., cultivada na Índia. Este corante é utilizado para conferir a cor amarela/alaranjada aos alimentos (Lidon

& Silvestre, 2007), sendo usado em diversos produtos alimentares, tais como produtos lácteos (pudins e cremosos), cereais, confeitaria, gelados, salsichas, bebidas, pickles, padaria, queijos, doces, geleias e em produtos salgados (Regulamento (UE) n.º 1129/2011; Lakshmi, 2014).

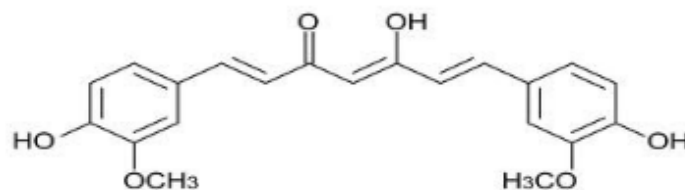


Figura 1.11: Fórmula Química do corante Curcumina.

Fonte: Lakshmi, 2014.

Atendendo ao Regulamento (UE) N.º1129/2011, 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 os pudins, o seu teor máximo de adição é de 150 mg/kg ou mg/l de produto. (Lopes et al., 2007)

O corante carminas (E120) apresenta a cor vermelha. É um glicósido fenólico que se encontra nos ovos e tecidos gordos da fêmea da cochonilha (*Coccus cacto* ou *Dactilopius coccus*) que vive em catos do género *Opuntia*, nas Ilhas Canárias e na América Central. O corpo seco de uma cochonilha contém, aproximadamente, 10% do princípio corante, que neste caso é o ácido carmínico. O corante natural E120 é um dos mais consumidos em todo o mundo e é usado na indústria alimentar, especialmente, em peixe (delícias do mar), conservas de fruta, carnes processadas (enchidos, hambúrgueres), compotas, bebidas alcoólicas (licores) e não alcoólicas (refrigerantes), bolos, iogurtes, produtos de confeitaria (gomas e doces), bolachas, gelados, sobremesas instantâneas, entre outros produtos alimentares (Pereira, 2019).

Segundo o Regulamento (UE) N.º1129/2011, o corante de carmina é classificado como um corante alimentar com um teor máximo em combinação, sendo que para o grupo das sobremesas, onde se incluem os pudins e cremosos, o seu teor máximo de adição é de 150 mg/kg ou mg/l de produto (Lopes et al., 2007).

O corante caramelo (E150a) é utilizado na indústria alimentar para conferir ou intensificar a cor amarela ou castanha. Este corante pode ser utilizado na generalidade dos produtos alimentares, nomeadamente em refrigerantes, cerveja preta, sopas, molhos e pudins. Até ao momento não se conhecem efeitos secundários apresentados por este aditivo (Lidon & Silvestre, 2007).

Segundo o Regulamento (UE) n.º 1129/2011 de 11 de novembro, na maioria dos produtos alimentares, este componente pode ser usado em quantidades *quantum satis*.

1.4.2.14) Edulcorantes

Os edulcorantes são substâncias de sabor doce que substituem o açúcar. Estas substâncias, por serem utilizadas em quantidades pequenas ou porque 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).

A sucralose (E955) é uma substância que tem 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, 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 (UE) n.º 1129/2011, o seu limite máximo permitido por 100 g de pudim é de 0,04 g (Lidon & Silvestre, 2007).

No caso da sucralose, o efeito de doçura é aumentado quando este aditivo se encontra em contacto com o edulcorante acessulfame-K, permitindo, assim, o efeito sinérgico entre eles (Schiffman et al., 1995). O acessulfame-K (E950) (**figura 1.12**) 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.

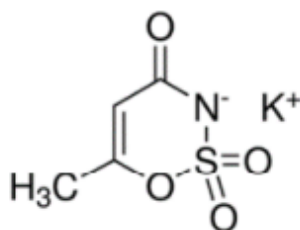


Figura 1.12: Fórmula Química do Acessulfame-K.
Fonte: Infinity Pharma, 2017.

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 pudim é de 0,035 g (Lidon & Silvestre, 2007; Comissão Europeia, 2001; Comissão Europeia, 2011).

2) Objetivos

O presente estudo teve como objetivo caracterizar, ao nível das propriedades microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, quatro sobremesas lácteas prontas para consumo – produtos novos da marca Condi Alimentar S.A. (Pudim Zero Flan, Pudim Zero Chocolate, Cremoso Nata-Caramelo e Cremoso Chocolate) - ao longo do seu prazo de validade, que neste caso foi de três meses (noventa dias). As sobremesas foram preparadas a nível industrial e identificadas, de acordo com a fase de produção (INÍCIO, MEIO e FIM) e, posteriormente, foram armazenadas a uma temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em frigoríficos.

O trabalho desenvolvido durante a componente prática consistiu em:

- Apurar a qualidade microbiológica das sobremesas instantâneas em estudo, fazendo análises de pesquisa/contagem de microrganismos totais a 30°C , psicrotróficos, leveduras, bolores e *Enterobacteriaceae* a 37°C e comparar os resultados com os Valores-Guia do subgrupo 1A estipulados pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (Saraiva et al., 2019);
- Estudar as propriedades físico-químicas dos produtos, através da medição de pH e da cor;
- Avaliar a aceitação dos produtos pelos consumidores em termos de doçura, aspeto, cor, textura e sabor, por meio de provas sensoriais hedónicas (testes de aceitação/preferência).

3) Materiais e Métodos

3.1) Equipamentos e meios de cultura

A lista dos equipamentos e dos meios de cultura utilizados durante a componente prática desta dissertação de mestrado pode ser encontrada no *Anexo I*.

3.2) Constituição de cada Sobremesa Láctea em estudo

As sobremesas em estudo foram:

- Pudim Zero Flan (constituído por água, leite em pó, amido, estabilizantes (goma de farinha de alfarroba e carragenina), aromas, corantes (betacaroteno, curcumina), sal e edulcorantes (sucralose, acessulfame-K);
- Pudim Zero Chocolate (constituído por água, leite em pó, chocolate (3%), amido, cacau (1%), estabilizantes (carragenina, goma de farinha de alfarroba, goma xantana), aromas, sal e edulcorantes (sucralose e acessulfame-K);
- Cremoso Nata-Caramelo (constituído por água, leite em pó, açúcar, nata (4%), chocolate branco, amido, farinha de aveia, aroma, gelificante (carragenina), corantes (betacaroteno, carminas, caramelo e curcumina);
- Cremoso Chocolate (constituído por água, leite em pó, amido, açúcar, aromas, nata, farinha de aveia, chocolate, gelificante (carragenina) e cacau (0,8%)).

3.3) Produção e Recolha das Amostras

As formulações de Pudim Zero Flan, Pudim Zero Chocolate, Cremoso Nata-Caramelo e Cremoso Chocolate foram efetuadas, à escala industrial, nas instalações da empresa, na Malveira.

Para cada sobremesa láctea, foi só produzido um único lote. As amostras foram recolhidas no dia em que foram produzidas e denominadas de acordo com a fase de produção, segundo um horário definido. Assim, as amostras INÍCIO correspondem ao início da produção, ao que foram retirados 48 packs, enquanto as amostras MEIO referem-se à etapa que corresponde ao meio da produção e foram retirados 16 packs e, por fim, as amostras FIM correspondem ao produto recolhido no final da produção industrial, ao que foram retirados 16 packs. Estas amostras foram embaladas em embalagens de poliestireno (PS) com capacidade máxima para 100 ml (*figura 3.1*). Posteriormente, recolheram-se algumas amostras de cada fase de produção e de seguida, foram transportadas por uma mala térmica, a uma temperatura de 4°C, até às outras instalações da Condi, que ficam em Loures. Até ao momento

de serem analisadas na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, ficaram armazenadas num frigorífico a uma temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. De seguida, as amostras para análise físico-química e microbiológica foram transportadas para o laboratório da FCT-UNL, em mala térmica, a uma temperatura 4°C . No laboratório foram armazenadas num frigorífico a uma temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, que representa a temperatura ideal de armazenamento para estas sobremesas, e sujeitas a análise ao longo do seu tempo de vida útil, que neste caso foi de três meses (noventa dias). Para cada análise microbiológica, físico-química e sensorial, foi utilizada uma amostra de cada fase de uma determinada sobremesa láctea em estudo. Na maioria dos casos, as análises foram feitas semanalmente ou de 15 em 15 dias. As amostras que permaneceram na empresa, foram igualmente armazenadas a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e sujeitas a avaliações sensoriais por um painel de provadores treinado, de modo a testar se os pudins zero e cremosos se encontravam dentro dos requisitos do consumidor.



Figura 3.1: Embalagens PS utilizadas para embalar as amostras.

3.4) Avaliação Microbiológica

3.4.1) Preparação de soluções e meios de cultura

3.4.1.1) Solução de Triptona-Sal

A Triptona-Sal é um diluente muito usado para diluições em série. No entanto, também serve para preparar os produtos lácteos para serem analisados microbiologicamente. A triptona contém aminoácidos e péptidos, resultantes da hidrólise pancreática da caseína (proteína principal do leite). Este componente serve para recuperar os microrganismos que sofreram tratamentos subletais. Enquanto que, o cloreto de sódio tem como função fornecer uma solução isotónica entre o diluente e o citoplasma celular, o que evita o efeito de osmose entre estes dois meios (Guerra, 2016; BLOKARA, 2020).

A Solução de Triptona-Sal para 1000 ml apresenta a seguinte composição:

- Triptona..... 1,0 g/L;
- Cloreto de Sódio (NaCl)..... 8,5 g/L.

A triptona-sal foi preparada por dissolução da triptona-sal (BIOKAR) em água Milli-Q, seguida de esterilização em autoclave, a uma temperatura de 122°C, durante 15 minutos.

3.4.1.2) Meio *Plate Count Agar* (PCA)

Para se proceder à pesquisa e posterior contagem de microrganismos totais a 30°C e a microrganismos psicrotróficos, recorreu-se ao meio PCA (meio não seletivo). Este meio de cultura é utilizado para quantificar microrganismos totais em produtos lácteos, água e alimentos. Neste meio, a triptona fornece os nutrientes, enquanto que o extrato de levedura dá as vitaminas. A glucose é o monossacárido fornecedor de energia para promover o crescimento de microrganismos (BIOKARb, 2020). Por fim, o agar bacteriológico confere solidez ao meio (KITLABOR, 2020).

Este meio para 1000 ml apresenta a seguinte composição:

- Triptona..... 5,0 g/L;
- Extrato de Levedura..... 2,5 g/L;
- Glucose (C₆H₁₂O₆)..... 1,0 g/L;
- Agar Bacteriológico..... 12,0 g/L.

O meio PCA foi preparado por dissolução do meio desidratado (BIOKAR) em água Milli-Q, seguida de esterilização em autoclave, a uma temperatura de 122°C, durante 15 minutos. O meio foi mantido a 44°C até à inoculação.

3.4.1.3) Meio *Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol Agar* (DRBC)

Com o intuito de pesquisar a presença de bolores e leveduras utilizou-se o meio seletivo DRBC (meio seletivo). Este meio é usado em produtos que tenham uma atividade da água (a_w) maior do que 0,95. O meio é constituído pelo corante *Rose Bengal*, que inibe o crescimento de bactérias e evita o crescimento excessivo de fungos filamentosos, funcionando também como corante que é assimilado pelas leveduras, originando colónias cor-de-rosa. O dicloran, também, evita o crescimento excessivo de fungos nas placas. Para além de conter o corante, possui igualmente cloranfenicol (antibiótico resistente ao calor) e cloridrato de clortetraciclina, que reforçam a inibição de bactérias. A polipeptona fornece os nutrientes necessários, enquanto que a glucose dá a energia essencial para o crescimento dos bolores e leveduras. O zinco e o cobre encontram-se ligados ao sulfato, o que estimula a produção

da pigmentação dos fungos filamentosos. O tergitol limita a proliferação de fungos *Mucoraceae*. (BIOKARc, 2020). Por último, o agar bacteriológico permite a solidificação do meio. O pH deste meio é de 5,6, o que impossibilita que os fungos se propaguem na Placa de Petri (Acumedia, 2016).

Para 1L, o meio DRBC apresenta a seguinte composição:

- Polipeptona..... 5,0 g/L;
- Glucose (C₆H₁₂O₆)..... 10,0 g/L;
- Fosfato Dipotássico (K₂HPO₄)..... 1,0 g/L;
- Sulfato de Magnésio (MgSO₄)..... 0,5 g/L;
- Dicloran..... 0,002 g/L;
- *Rose Bengal*..... 0,025 g/L;
- Cloranfenicol..... 0,05 g/L;
- Sulfato de Zinco (ZnSO₄)..... 0,01 g/L;
- Sulfato de Cobre (CuSO₄)..... 0,005 g/L;
- Tergitol..... 1,0 ml;
- Cloridrato de Clortetraciclina..... 0,05 g/L;
- Agar Bacteriológico..... 12,4 g/L.

O meio DRBC foi preparado por dissolução do meio desidratado (BIOKAR) em água Milli-Q, seguida de esterilização em autoclave, a uma temperatura de 122°C, durante 15 minutos. Após esterilização o meio foi distribuído por placas de Petri estéreis (20 ml por placa de Petri). Após a solidificação deste, as placas foram guardadas ao abrigo da luz até serem usadas na fase de inoculação.

3.4.1.4) Meio Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)

Para despistar se as amostras se encontravam contaminadas com *Enterobacteriaceae*, utilizou-se o meio seletivo diferencial VRBG, que contém cristal violeta e sais biliares que inibem, simultaneamente, a presença de bactérias gram-positivas. A digestão enzimática de tecidos animais fornece o azoto, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais para o crescimento destas bactérias. O extrato de levedura fornece vitaminas, particularmente as do grupo B.

A fermentação da glucose existente no meio origina originando uma cor avermelhada nas colónias, devido à presença do indicador de pH (vermelho neutro) (BIOKARd, 2020; Sigma-Aldrich, 2020; Laborclin, 2019). Por fim, o agar bacteriológico confere a solidez necessária para o meio (Acumedia, 2014).

Para 1000 ml, o meio VRBG apresenta a seguinte composição:

- Digestão enzimática de tecidos animais..... 7,0 g/L;
- Extrato de levedura..... 3,0 g/L;
- Glucose (C₆H₁₂O₆)..... 10,0 g/L;
- Sais Biliares..... 1,5 g/L;
- Cloreto de Sódio (NaCl)..... 5,0 g/L;
- Vermelho Neutro..... 0,03 g/L;
- Cristal Violeta..... 0,002 g/L;
- Agar Bacteriológico..... 13,0 g/L.

O meio VRBG foi preparado por dissolução do meio desidratado (BIOKAR) em água Milli-Q. Em seguida, 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.

3.4.2) Métodos diretos de Pesquisa e de Contagem Microbiana

Para avaliar a durabilidade, e a possível extensão do prazo de vida útil do produto, realizaram-se análises microbiológicas periódicas a cada sobremesa. Para isso, aplicaram-se as normas ISO (Organização Internacional de Normalização) que são usadas com o objetivo de se alcançar a uniformidade e de promover a normalização de atividades relacionadas com a qualidade e segurança alimentar. Nessas normas estão especificados os métodos horizontais de enumeração utilizados para cada microrganismo, ou seja, os métodos que são utilizados para pesquisa de microrganismos nos géneros alimentícios (alimentos destinados para consumo humano), tendo por finalidade garantir que o produto é seguro quando o ser humano os for consumir (ISO 22000:2005).

3.4.2.1) Preparação das Amostras

Para cada amostra fizeram-se análises em condições de assepsia numa câmara de fluxo laminar vertical (STERIL-HELIOS, Itália), onde foi preparada a suspensão inicial. Para isso, utilizou-se um saco estéril (VWR, PA, EUA) de capacidade de 400 ml, onde se colocou 10 g do alimento pesado em condições de assépsia, e 90 ml de solução triptona-sal. De seguida, a suspensão foi homogeneizada em *Stomacher* (VWR, Star Blender LB 400, PA, EUA), durante trinta segundos. Em seguida prepararam-se diluições seriadas, da suspensão inicial em triptona-sal. A [figura 3.2](#) demonstra o modo como foi feito este procedimento.

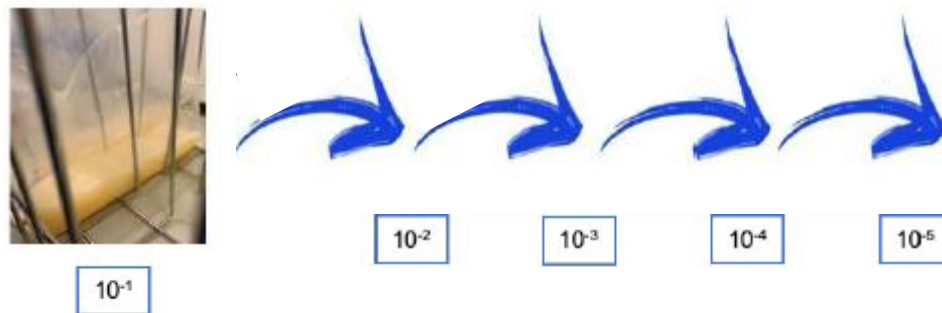


Figura 3.2: Processo de preparação das diluições seriadas de 10^{-1} , até à diluição 10^{-5} .

Nota: Cada diluição foi preparada por transferência de 1 ml da diluição anterior em 9 ml de triptona-sal.

3.4.2.2) Método Horizontal de Enumeração de Microrganismos Aeróbios Totais a 30°C , segundo a norma ISO 4833-1:2013

De modo a proceder à fase de inoculação dos microrganismos aeróbios totais a 30°C , utilizou-se a técnica de sementeira por incorporação/profundidade. Assim, inoculou-se 1 ml da suspensão inicial e 1 ml das restantes diluições para placas de Petri estéreis. Logo de seguida, adicionou-se 20 ml do meio de cultura a cada placa e misturou-se cautelosamente, de forma a garantir que a distribuição do inóculo estivesse uniforme. Quando o meio solidificou, as placas foram incubadas, de forma invertida, numa estufa a uma temperatura de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Memmert, Alemanha), durante 72 ± 3 horas e em condições de aerobiose. Após esse período, procedeu-se à leitura do número total de colónias formadas em cada uma das placas até um máximo de 300 UFC. Por fim, esse número foi convertido para unidades formadoras de colónias por grama (UFC/g).

3.4.2.3) Método Horizontal de Enumeração de Microrganismos Psicotróficos, segundo a norma ISO 17410:2019

A pesquisa de microrganismos psicotróficos foi efetuada igualmente em meio PCA. No entanto, uma vez que os microrganismos psicotróficos são sensíveis ao calor a inoculação foi realizada por espalhamento à superfície. Para tal procedeu-se à inoculação de 1 ml da suspensão inicial, distribuído por três placas diferentes, e $100 \mu\text{l}$ das respetivas diluições decimais (até à diluição 10^{-5}) em cada placa de Petri, em condições de assepsia. As placas foram incubadas, em posição invertida, num frigorífico a uma temperatura de $6,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 240 horas e em condições de aerobiose. Depois desse tempo, as placas foram lidas, de modo a determinar o número de colónias formadas até um máximo de 300 UFC. Seguidamente, esse número foi alterado para unidades formadoras de colónias por grama (UFC/g).

3.4.2.4) Método Horizontal de Enumeração de *Enterobacteriaceae*, segundo a norma ISO 21528-2:2017

A pesquisa de *Enterobacteriaceae* foi efetuada por sementeira por incorporação/profundidade. Assim, em condições de assepsia, inoculou-se 1 ml de suspensão inicial e 1 ml das restantes diluições para placas de Petri estéreis. De seguida, adicionou-se 10 ml de meio VRBG a 44 °C a cada uma das placas e misturou-se cautelosamente para uniformizar a distribuição do inóculo e deixou-se solidificar. Por último, adicionaram-se mais 15 mL de meio VRBG (*overlay*) e deixou-se solidificar. A segunda camada de meio, pretende limitar o crescimento excessivo das colónias e atingir 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).

As placas que apresentassem presentes colónias características, foi necessário operar à sua confirmação através da realização de testes da oxidase e da fermentação da glucose. Para isso, repicaram-se as colónias para placas de Petri que continham meio rico Triptona Soja Agar (BIOKAR, BK047) (meio não seletivo) e de seguida, incubaram-se as placas a uma temperatura de 37 ± 2 °C, durante 24 ± 2 horas. Posteriormente, fez-se o teste da oxidase. Para isso, transferiu-se, com o auxílio de uma ansa, as colónias a confirmar para tiras, com intuito de se fazer o teste Oxidase (Pyo Test™). O resultado só é positivo, se visualizar uma coloração azulada, após 10 segundos.

Para as colónias que apresentaram resultado negativo, foram transferidas para placas que continham o meio Glucose OF agar. Este meio é constituído por:

- Digerido enzimático de caseína..... 2,0 g/L;
- Glucose (C₆H₁₂O₆)..... 10,0 g/L;
- Cloreto de sódio (NaCl)..... 5,0 g/L;
- Hidrogenofosfato dipotássico (K₂HPO₄)..... 0,3 g/L;
- Azul de bromotimol..... 0,08 g/L;
- Agar..... 4,0 g/L.

O digerido enzimático de caseína fornece azoto, minerais, vitaminas e aminoácidos essenciais para o crescimento das colónias. O cloreto de sódio garante o equilíbrio osmótico. O hidrogenofosfato dipotássico funciona como tampão. A glucose funciona como uma fonte de energia. O azul de bromotimol funciona como um indicador de pH. Por último, o agar confere solidez ao meio (Condalab, 2020).

Para se preparar o meio Glucose OF agar, foi necessário dissolver 21,38 g de meio desidratado (Condalab, Cat.2150) em 1000 ml de água Milli-Q. Depois, o meio foi aquecido, numa placa elétrica, sob agitação até se dissolver tudo tendo, de seguida, sido distribuído por tubos de ensaio em volumes de 10 ml por tubo. Posteriormente, os tubos foram esterilizados a 122°C ao longo de 15 minutos, numa autoclave, e de seguida, foram arrefecidos em posição vertical. De seguida, esses tubos foram

aquecidos em banho de água a ferver, durante 15 minutos com o objetivo de eliminar o oxigénio e, por fim, foram arrefecidos até aos 37°C. O último passo, foi inocular os tubos. Para isso, cobriu-se a superfície do meio com 1 cm de parafina líquida estéril, de forma a garantir condições anaeróbias, e incubou-se a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 ± 2 horas. A fermentação da glucose pode ser vista através do desenvolvimento de uma coloração amarela.

A confirmação foi efetuada, caso se as bactérias apresentassem, simultaneamente, reação negativa ao teste da oxidase e reação positiva ao teste da fermentação da glucose.

3.4.2.5) Método Horizontal de Enumeração de Bolores e Leveduras, segundo a norma ISO 21527-1:2008

Utilizou-se a técnica por espalhamento à superfície, com o objetivo pesquisar a presença de bolores e leveduras. Em condições de assepsia, inoculou-se 1 ml da suspensão inicial, distribuído por 3 placas de Petri e 500 µl das restantes diluições em placas de Petri contendo o meio DRBC. De seguida, procedeu-se à incubação das placas, sendo que estas não podiam ser invertidas, para evitar a dispersão dos esporos, numa estufa a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Mettler, Alemanha), durante 120 ± 2 horas e em condições de aerobiose. Após este período, realizou-se a contagem de leveduras e bolores. As leveduras apresentam uma cor mais rosada, enquanto que os bolores formam colónias grandes e planas podendo a cor ser variável, dependendo da sua morfologia. A enumeração de cada microrganismo foi feita individualmente até um máximo de 150 UFC. Por último, o número de colónias aferido foi transformado em unidades formadoras de colónias por grama (UFC/g).

3.5) Avaliação Físico-Química

De forma a determinar as propriedades físico-químicas das sobremesas instantâneas em estudo procedeu-se à realização de análises periódicas ao pH e à cor.

3.5.1) Determinação do pH

Para determinar o valor de pH para cada uma das amostras utilizou-se o eletrodo de pH (HANNA Instruments, HI-2210-02 Bench Top pH Meter, Portugal), previamente calibrado com duas soluções padrão: pH = 7,00 e pH = 4,01. De seguida, o eletrodo foi inserido no centro das diferentes amostras, e, após estabilização, registou-se o valor de pH.

3.5.2) Determinação da Cor

A cor de cada sobremesa foi determinada com recurso a um colorímetro Croma Meter CR-410 (Konica Minolta, Tokyo, Japão), com uma fonte de luz D 65, com um ângulo visual de 10° e com uma área de medição de 50 mm. Nesta medição determinaram-se as coordenadas do sistema de escala de Hunter (L*, a* e b*). A vantagem em usar este colorímetro é que pode ser utilizado em alimentos com superfícies e textura irregulares ou com muita variação de cor (Konica Minolta, a) 2020).

Para definir as coordenadas do sistema de escala de Hunter (L*, a* e b*), calibrou-se, primeiramente, o colorímetro com uma placa-padrão de cerâmica branca e, posteriormente, colocaram-se as amostras, que se encontravam em placas de Petri, sobre fundos brancos padronizados. Com o colorímetro calibrado fizeram-se três medições à temperatura ambiente para cada formulação e calculou-se a respetiva média e desvio-padrão. Conhecendo o valor das coordenadas, foi possível calcular o valor total da mudança de cor (ΔE) (equação 1), em que as variações de cada coordenada (L – L*, a – a* e b – b*) fizeram-se em relação aos dados determinados no tempo inicial (T0); bem como o valor do **Ângulo de Hue** (equação 2), que determina a tonalidade da cor (0° – Vermelho; 90° – Amarelo, 180° – Verde; 270° – Azul) (Konica Minolta, b) 2020) e, por último, as coordenadas Chroma (**C***) (equação 3) essenciais para a avaliação da qualidade do alimento, sendo que quanto maior for o seu valor, mais forte e brilhante é a cor (Mohammadi et al., 2008; Rebelo, 2017).

$$\Delta E = \sqrt{(L - L^*)^2 + (a - a^*)^2 + (b - b^*)^2} \quad (\text{equação 1})$$

$$\text{Hue Angle} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (\text{se } a^* > 0) \quad (\text{equação 2})$$

$$\text{Hue Angle} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) + 180^\circ \quad (\text{se } a^* < 0)$$

$$c^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{equação 3})$$

3.6) Avaliação Sensorial

Com o intuito de avaliar se existiram alterações sensoriais nas sobremesas em estudo ao longo do tempo de vida útil foram realizadas provas sensoriais hedónicas (testes de aceitação/preferência), desde o dia da produção até ao dia indicado no prazo de validade. As provas decorreram na sala de provas do Departamento de Investigação e Desenvolvimento da empresa Condi Alimentar, S.A., onde se encontram quatro cabines brancas individuais isentas de cheiros e de ruído que possam modificar o processo da prova sensorial em curso, e que possuem condições de iluminação, temperatura e humidade controladas. O painel era constituído por 6 provadores treinados pertencentes à equipa de Investigação e Desenvolvimento da empresa. No total, fizeram-se quatro avaliações sensoriais a três sobremesas em desenvolvimento (**tabela 3.2**): duas ao Pudim Zero Flan, uma ao Pudim Zero Chocolate e uma ao Cremoso Chocolate.

Tabela 3.1: Descrição das provas sensoriais realizadas, em dias diferentes, durante o tempo de armazenamento das sobremesas instantâneas em estudo.

Produto Avaliado	Número da Avaliação	Fase de Produção Testada	Constituição do Painel
Pudim Zero Flan	1ª	INÍCIO, FIM	6 pessoas das quais 5 do sexo feminino e 1 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos
	2ª	INÍCIO	6 pessoas das quais 5 do sexo feminino e 1 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos
Pudim Zero Chocolate	1ª	INÍCIO, MEIO, FIM	5 pessoas das quais 4 do sexo feminino e 1 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 20 e os 50 anos
Cremoso Chocolate	1ª	INÍCIO, MEIO, FIM	6 pessoas das quais 5 do sexo feminino e 1 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos

Conforme já referido, até à realização das provas, as amostras estiveram conservadas, a uma temperatura controlada de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, num frigorífico localizado dentro das instalações do Departamento de Investigação e Desenvolvimento da empresa Condi Alimentar, S.A.. No momento das provas, as amostras foram dadas aos provadores, ao mesmo tempo e adequadamente identificadas de acordo com a fase de produção. Primeiramente, foi dada uma folha de prova (ver *figura All.1* do *Anexo II*) a cada provador, onde este tinha que classificar cada fase de produção em termos de Aspeto, Cor, Textura, Sabor e, no final, indicar a sua Classificação Geral, segundo uma escala numérica de um a cinco, sendo: 1) Não Gostei Nada; 2) Gostei Pouco, 3) Gostei; 4) Gostei Muito; 5) Excelente. O parâmetro Doçura, foi classificado numa outra escala numérica também de um a cinco, sendo: 1) Sem Doce; 2) Pouco Doce; 3) Gosto Mesmo; 4) Muito Doce; 5) Exageradamente Doce. A ordem de degustação foi feita de acordo com a linha de produção, isto é, pediu-se aos provadores que comessem pela amostra que constava como INÍCIO, seguidamente, a amostra identificada como MEIO, e no final, a amostra denominada FIM. Após provada uma das fases de produção de uma determinada sobremesa, e antes de se iniciar a degustação da fase seguinte, os provadores beberam água e consumiram bolachas de água e sal, visto que estes produtos tinham uma consistência sólida.

Na mesma folha de prova, perguntou-se ao provador qual a sua intenção de compra em relação a estes produtos. Em caso de resposta afirmativa, questionou-se, ainda, qual a fase de produção que mais lhe tinha agradado. A última pergunta consistia em saber se o provador recomendaria o produto a outro consumidor e, em caso afirmativo, qual a fase de produção que iria recomendar.

3.6) Análise Estatística

Na análise estatística utilizou-se o *software* STATISTICA 7.0[®]. A significância entre as diferenças foi calculada usando o teste estatístico ANOVA (análise paramétrica), onde se aplicou o teste de comparação de *Tukey*. Antes de realizar os testes estatísticos foram avaliados os pressupostos de cada uma das análises, ou seja, a homogeneidade de variância e a normalidade dos resíduos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

4) Resultados e Discussão

Neste capítulo encontram-se os resultados obtidos da avaliação microbiológica, físico-química e sensorial às quatro sobremesas estudadas nas três fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM) durante o seu período de armazenamento, que neste caso foi de três meses (noventa dias), a uma temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.1) Avaliação Microbiológica

Para cada sobremesa láctea, na respetiva fase de produção (INÍCIO, MEIO e FIM), realizou-se a pesquisa e contagem dos microrganismos indicadores de higiene e de qualidade, nomeadamente os microrganismos totais a 30°C , os bolores e leveduras, *Enterobacteriaceae* a 37°C e, por fim, os microrganismos psicrotróficos.

Depois da conversão do número de microrganismos para log UFC/g, de modo a poder validar se os resultados obtidos eram favoráveis, foi efetuada a comparação com os valores-guia referentes aos alimentos prontos para consumo não manuseados após o tratamento térmico (subgrupo 1A), estabelecidos pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e publicados em Saraiva et al. (2019) (*tabela 4.1*). Na elaboração destes valores-guia não foram contemplados os microrganismos psicrotróficos, no entanto, é indicado que estes microrganismos podem ser um melhor indicador de deterioração em géneros alimentícios que são conservados em refrigeração ou em congelação (Saraiva et al., 2019). Por este motivo, os microrganismos psicrotróficos foram também pesquisados.

Os resultados obtidos nas análises podem ser classificados em três níveis (Saraiva et al., 2019; p.22):

- **Satisfatório:** “o resultado analítico encontra-se dentro dos valores previstos, ou seja, inferior ou igual ao Valor Máximo de Referência (VMR)”;
- **Questionável:** “o resultado analítico é superior ao VMR e inferior ou igual ao Valor Máximo Admissível (VMA) indicando que há probabilidade de existirem falhas nos processos. Recomenda-se que seja efetuada uma análise de causas, de forma a esclarecer a causa provável”;
- **Não Satisfatório:** “o resultado analítico é superior ao VMA e indica que há falhas nos processos. Deve ser efetuada uma análise de causas, de forma a esclarecer a causa provável”.

Tabela 4.1: Valores-Guia, respeitante aos microrganismos indicadores de higiene e de alteração utilizados para avaliação microbiológica da qualidade de alimentos prontos para consumo não manuseados após o tratamento térmico (subgrupo 1A).

Nível de Qualidade Microbiológica	<i>Enterobacteriaceae</i> a 37°C (log UFC/g)	Microrganismos Totais a 30°C (logUFC/g)	Bolores (log UFC/g)	Leveduras (logUFC/g)
Satisfatório	< 2	< 3	< 2,70	< 3
Questionável	2 - ≤ 3	3 - ≤ 4	2,70 - ≤ 3	3 - ≤ 4
Não Satisfatório	> 3	> 4	> 3	> 4

Fonte: Adaptado de (Saraiva et al., 2019).

4.1.1) Pudim Zero Flan & Pudim Zero Chocolate

Os resultados das avaliações microbiológicas ao Pudim Zero Flan (INÍCIO, MEIO e FIM) e ao Pudim Zero Chocolate (INÍCIO, MEIO e FIM) encontram-se descritos na **tabela 4.2** e na **tabela 4.3**, respetivamente.

Tabela 4.2: Resultados dos ensaios microbiológicos feitos ao Pudim Zero Flan nas diversas fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM). Os resultados encontram-se representados pelos valores médios ± desvio padrão.

Tempo de Armazenamento (dias)	Microrganismos				
	<i>Enterobacteriaceae</i> e a 37°C (log UFC/g)	Microrganismos Totais a 30°C (log UFC/g)	Bolores (log UFC/g)	Leveduras (log UFC/g)	Psicrotróficos (log UFC/g)
INÍCIO					
5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
26	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
47	< 1,0	1,9 ± 0,0	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
54	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
63	< 1,0	3,2 ± 1,8	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
MEIO					
26	< 1,0	Incontável	< 1,0	< 1,0	< 1,0
47	< 1,0	5,9 ± 0,3	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
54	< 1,0	5,2 ± 0,3	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
FIM					
5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
26	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
47	< 1,0	1,0 ± 0,0	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
54	< 1,0	1,3 ± 0,0	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
63	< 1,0	1,0 ± 0,0	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
130	< 1,0	3,8 ± 1,0	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}

^{a)} Neste dia, não se fez análise a este parâmetro. Células a verde: resultados satisfatórios; células a vermelho: resultados não satisfatórios.



Figura 4.1: Aspetto das placas de microrganismos totais a 30°C obtidas com as amostras de Pudim Zero Flan.

Tabela 4.3: Resultados dos ensaios microbiológicos feitos ao Pudim Zero Chocolate nas diversas fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM). Os resultados encontram-se representados pelos valores médios \pm desvio padrão.

Tempo de Armazenamento (dias)	Microrganismos				
	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> a 37°C (log UFC/g)	Contagem de Microrganismos Totais a 30°C (log UFC/g)	Contagem de Bolores (log UFC/g)	Contagem de Leveduras (log UFC/g)	Contagem de Psicotróficos (log (UFC/g))
INÍCIO					
10	< 1,0	4,4 \pm 0,6	< 1,0	< 1,0	< 1,0
67	< 1,0	5,8 \pm 0,1	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
MEIO					
10	< 1,0	4,2 \pm 0,3	< 1,0	< 1,0	< 1,0
80	< 1,0	6,0 \pm 1,7	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
FIM					
10	< 1,0	5,0 \pm 0,3	< 1,0	< 1,0	< 1,0
94	< 1,0	5,2 \pm 1,7	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}

^{a)} Neste dia, não se fez análise a este parâmetro. Células a verde: resultados satisfatórios; células a vermelho: resultados não satisfatórios.

De acordo com os resultados apresentados pelo Pudim Zero Flan (**tabela 4.1**), verificou-se que as amostras não tiveram qualquer contaminação por parte de *Enterobacteriaceae*, nem de bolores, leveduras ou de microrganismos psicotróficos, o que demonstra a existência de um total de 100% de resultados satisfatórios em qualquer fase de produção. Contrariamente, no caso dos microrganismos totais a 30°C, a amostra INÍCIO teve 80% de resultados satisfatórios e 20% de não satisfatórios, enquanto que na amostra MEIO se verificaram 100% de resultados não satisfatórios e, por último, na amostra FIM houve 83,33% de resultados satisfatórios e 16,67% de não satisfatórios.

De acordo com os dados fornecidos pela **tabela 4.2**, verificamos que houve 100% de resultados satisfatórios nos microrganismos psicotróficos, nas *Enterobacteriaceae* a 37°C e nos bolores e leveduras. Inversamente, nos microrganismos totais a 30°C, em qualquer das fases de produção se verificaram 100% de resultados não satisfatórios.

Nos microrganismos mesófilos totais a 30°C incluem-se bolores, leveduras e bactérias. As temperaturas ótimas de desenvolvimento para estes microrganismos são moderadas, ou seja, entre 30°– 37°C e a temperatura mínima está perto dos 7°C (FAO, 2016; Saraiva et al., 2019).

A contagem destes microrganismos serve como indicador geral de qualidade alimentar. Logo, um grande número de microrganismos totais a 30°C pode indicar se houve práticas de higiene ineficientes e, por isso, a probabilidade de existirem microrganismos causadores de doenças, ao longo do tempo, é maior (Monteiro, 2016). Assim, este indicador serve para medir se as matérias-primas que foram utilizadas para a produção são de fraca qualidade; se houve uma higienização deficiente de superfícies ou uma quebra na cadeia de frio; evidencia ainda se ocorreram eventuais contaminações cruzadas; se existiu um tratamento térmico insuficiente e/ou que o tempo/temperatura de manutenção e/ou conservação não foram devidamente controlados durante as fases de processamento, armazenamento e distribuição dos produtos alimentares (Saraiva et al., 2019). No entanto, este indicador é fraco em termos de segurança alimentar, devido ao facto de não se correlacionar diretamente com a presença de agentes patogénicos ou de toxinas (MBL, 2014).

Segundo os dados demonstrados pela **tabela 4.2**, constatamos que as amostras INÍCIO mantiveram-se satisfatórias até ao dia 54, as amostras FIM, até ao dia 63, enquanto que as amostras MEIO nunca apresentaram resultados satisfatórios em relação aos mesofilos totais. As amostras INÍCIO não conseguiram manter a sua estabilidade microbiológica durante os 90 dias, tal como era pretendido. No caso das amostras FIM, uma vez que não se conseguiram realizar análises entre os dias 63 (resultados satisfatórios) e 130 (resultados não satisfatórios) não foi possível verificar se as amostras permaneceram ou não estáveis durante 90 dias.

Os resultados obtidos com as amostras MEIO indicam que as condições de correta higienização não foram mantidas durante toda a produção. Uma vez que o armazenamento das amostras foi efetuado exatamente nas mesmas condições que as amostras INÍCIO e FIM não se pode considerar como explicação para os resultados obtidos nas amostras MEIO uma possível quebra na cadeia de frio. As amostras nesta fase de produção (MEIO) apresentavam-se separadas em duas fases: uma mais gelificada incolor e com uma certa turbidez (parte de cima) e outra mais amarelada (parte de baixo) (ver **figura AIII.1 (B)**, **Anexo III**). Este aspeto já poderá ter sido um sinal de deterioração devida ao crescimento microbiológico.

Na **tabela 4.3** relativa ao Pudim Zero Chocolate, o aparecimento de microrganismos totais a 30°C deu-se logo no início do estudo da sua vida útil, assim continuando em todas as fases de produção. Os Pudins Zero Chocolate apresentavam “bolhas” na textura e sinérese. Estes fatores são indicativos de deterioração, visto que podem estar relacionado com o crescimento microbiano. As atividades metabólicas dos microrganismos fazem com que haja produção de compostos voláteis e de ácidos orgânicos, nomeadamente do ácido láctico e do ácido succínico, assim provocando alterações ao nível da aparência, da formação de sabores e de odores desagradáveis e modificações de pH (principalmente, o fenómeno de acidificação, devido ao consumo de lactose por parte dos microrganismos), nas sobremesas lácteas, enquanto os compostos voláteis caracterizam as bactérias que estão envolvidas na deterioração das sobremesas lácteas (Leal, 2019; Techer et al., 2020).

Uma possível explicação para os resultados obtidos pode ter sido a contaminação por parte de uma matéria-prima ou o resultado da má higienização do equipamento. No dia em que se produziu esta sobremesa utilizaram-se os bicos de enchimento das gelatinas, pelo que estas podiam não estar bem higienizadas e, conseqüentemente, contaminarem o produto. No entanto, existem outras razões que podem ter contribuído para a contaminação, tais como a ocorrência de contaminações cruzadas; contaminação proveniente dos materiais de embalagem; insuficiente temperatura/tempo de confeção.

O conteúdo em nutrientes do Pudim Zero Chocolate também pode ter contribuído para o maior crescimento microbiano. Um dos ingredientes constituintes desta sobremesa é o leite. Este componente é rico em açúcares, principalmente por lactose, em proteínas e possui um pH entre 6 e 7, pelo que constitui uma boa fonte de desenvolvimento microbiano (Armnianos et al., 2017). Quando o leite se encontra em contacto com o chocolate, pode fazer com que haja uma maior tendência para se desenvolverem microrganismos na sobremesa. Por exemplo a comparação do grau de contaminação de leite com chocolate, processado a temperatura de 75°C durante 15 segundos, e de leite simples, processado a 72°C durante o mesmo tempo, revelou que após catorze dias do pós-armazenamento dos leites, o leite com chocolate apresentava uma maior contaminação de microrganismos totais, por comparação com o leite simples, apesar de no início os valores destes microrganismos serem idênticos (Jay et al., 2008).

Os psicotróficos são microrganismos capazes de crescer a temperaturas mínimas de 0 – 7°C, possuem uma temperatura ótima de crescimento entre os 20 e os 30°C e uma temperatura máxima de até 43°C (Jay et al., 2008). Logo, como crescem a temperaturas baixas, estes microrganismos são ótimos indicadores de deterioração para alimentos que sejam conservados a temperaturas de congelação e de refrigeração (Saraiva et al., 2019). De acordo com as [tabelas 4.2 e 4.3](#), em ambos os pudins verificou-se que não houve contaminação de psicotróficos. No entanto esta análise não pode ser efetuada até aos 90 dias previstos.

As *Enterobacteriaceae* a 37°C, são bactérias gram-negativas, não são formadoras de esporos, podendo ser aeróbias e/ou anaeróbias facultativas (Adams & Moss, 2008; Baylis et al., 2011). Nesta família de bactérias encontram-se incluídas bactérias psicotróficas, mesófilas e termotolerantes, sendo que a maioria são mesófilas. A maioria das *Enterobacteriaceae* conseguem desenvolver-se com valores de a_w acima dos 0,95 e com um limite mínimo aproximado de 0,94. Relativamente ao pH, o pH mínimo de crescimento é de 3,8 com um limite superior de 9,0 (Baylis et al., 2011). Os principais géneros da família das *Enterobacteriaceae* são inócuos para o ser humano (algumas estirpes da *Escherichia coli*), mas outros são patogénicos, tais como a *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter* spp. ou *Shigella* spp. (Adams & Moss, 2008; Baylis et al., 2011). Estas bactérias encontram-se presentes de forma natural no trato gastrointestinal dos animais de sangue quente e do Homem e em matérias-primas vegetais que se encontram disseminadas no meio ambiente (água, solo, plantas) (Saraiva et al., 2019). Devido à distribuição ubíqua destes microrganismos no ambiente, é inevitável que algumas estirpes entrem na cadeia alimentar e, conseqüentemente, causem doenças de origem alimentar e a deterioração dos alimentos (Baylis et al., 2011).

Com estes microrganismos é possível determinar o grau de higiene de um determinado alimento. Caso apareçam após a ocorrência de um tratamento térmico, isso quer dizer que este foi feito de uma

forma inadequada ou, então, que ocorreu uma contaminação após a fase de processamento. São usados, também, como indicativo para determinar se a lavagem e a desinfecção foram feitas de forma eficiente. No caso de produtos alimentares com prazos de validade longos, os níveis de *Enterobacteriaceae* devem ser vistos como indicadores de alteração e não de higiene. Como já foi referido anteriormente, estes indicadores mostram se houve uma adequada higienização e lavagem e um tempo de utilização controlado, especialmente em produtos que contenham frutos, produtos hortícolas e outros produtos crus prontos para serem consumidos. Estes microrganismos são sensíveis a temperaturas elevadas (tratamentos térmicos), pois têm uma baixa resistência ao calor e podem ser eliminados através do uso de agentes desinfetantes que são utilizados na higienização de superfícies, de equipamentos e de instalações e na produção alimentar. Algumas *Enterobacteriaceae* conseguem desenvolver-se sob temperaturas de refrigeração, pelo que quando o alimento for consumido é natural que apresente um número mais elevado destes microrganismos do que no fim do processamento (Saraiva et al., 2019).

Conforme as **tabelas 4.2 e 4.3**, verifica-se que, ao longo de todo o tempo de armazenamento, não houve contaminação por *Enterobacteriaceae*, ou seja, em relação a este grupo de organismos foi possível verificar a estabilidade dos produtos durante os 90 dias de prazo de validade pretendido.

As leveduras e os bolores conseguem desenvolver-se a baixas temperaturas, a uma baixa a_w e num meio com acidez (baixo pH). Os bolores são aeróbios estritos, enquanto que as leveduras são aeróbias facultativas. Estes microrganismos encontram-se espalhados pelo meio ambiente e em produtos de origem vegetal, pelo que podem ser transmitidos para os alimentos através do contacto com equipamentos que se encontram contaminados ou por exposição ao ar. Também, podem ser contaminantes de ingredientes utilizados durante a fase de processamento. Estes agentes de alteração, normalmente, estão associados à deterioração de alimentos com baixa a_w , açucarados ou fermentados, podendo degradar alimentos refrigerados (queijos), frescos (legumes), ácidos (sumos de fruta) e secos (charcutaria). Níveis elevados de levedura no alimento ($>10^6$ UFC/g) podem conferir alterações no sabor, enquanto que níveis entre $10^6 - 10^7$ UFC/g provocam a degradação do produto alimentar devido à produção de ácidos e de gases (Saraiva et al., 2019).

Conforme os resultados apresentados pelas **tabelas 4.2 e 4.3**, verificou-se que em nenhuma das análises realizadas se verificou a presença de bolores ou de leveduras, sendo, assim, possível verificar a estabilidade dos produtos durante os 90 dias de prazo de validade pretendido

Em suma, o Pudim Zero Chocolate, em todas as fases de produção, apresentou, resultados não satisfatórios por parte dos microrganismos totais a 30°C. Logo, após a realização de duas análises a esta sobremesa, verificou-se que esta produção se mostrou ineficaz e não garantiu o tempo de vida útil estipulado (três meses), o que significa que deve haver alterações a nível da preparação e do embalamento. Uma maneira de contornar este problema seria mudar a formulação deste pudim nos reatores.

Relativamente ao Pudim Zero Flan, a fase MEIO apresentou desde o início resultados não satisfatórios. Uma forma de ultrapassar este problema seria rever o processo de processamento durante esta fase de produção.

A estabilidade microbiológica destas sobremesas, e o respetivo prolongamento do prazo de validade, também pode ser conseguido através do uso de conservantes. Estes ingredientes podem ser baseados em ingredientes naturais ou ter caráter químico. Esta classe de ingredientes evita ou atrasa a formação de microrganismos, nomeadamente bolores, leveduras, bactérias e de toxinas formadas pelos bolores e bactérias, evitando, assim, a deterioração do alimento. Em suma, o principal objetivo da utilização de conservantes é aumentar ou manter a segurança alimentar do produto (Young & O'Sullivan, 2011).

4.1.2) Cremoso Chocolate & Cremoso Nata-Caramelo

As **tabelas 4.4 e 4.5** demonstram os resultados das análises microbiológicas obtidos nas diferentes fases de processamento (INÍCIO, MEIO e FIM) relativos ao Cremoso Chocolate e Cremoso Nata-Caramelo, respetivamente.

Tabela 4.4: Resultados dos ensaios microbiológicos feitos ao Cremoso Chocolate nas diversas fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM). Os resultados encontram-se representados pelos valores médios \pm desvio padrão.

Tempo de Armazenamento (dias)	Microrganismos				
	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> a 37°C (log UFC/g)	Contagem de Microrganismos Totais a 30°C (log UFC/g)	Contagem de Bolores (log UFC/g)	Contagem de Leveduras (log UFC/g)	Contagem de Psicotróficos (log UFC/g)
INÍCIO					
5	< 1,0	1,0 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1	< 1,0	X ^{a)}
68	< 1,0	3,0 \pm 0,0	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
97	< 1,0	2,0 \pm 1,4	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
MEIO					
5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
68	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
97	< 1,0	5,00	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
FIM					
5	< 1,0	4,70 \pm 2,12	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
68	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}
97	< 1,0	2,0 \pm 0,0	< 1,0	< 1,0	X ^{a)}

^{a)} Neste dia, não se fez análise a este parâmetro. Células a verde: resultados satisfatórios; células a vermelho: resultados não satisfatórios; célula a amarelo: resultado questionável.

Tabela 4.5: Resultados dos ensaios microbiológicos feitos ao Cremoso Nata-Caramelo nas diversas fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM). Os resultados encontram-se representados pelos valores médios \pm desvio padrão.

Tempo de Armazenamento (dias)	Microrganismos				
	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> a 37°C (log UFC/g)	Contagem de Microrganismos Totais a 30°C (log UFC/g)	Contagem de Bolores (log UFC/g)	Contagem de Leveduras (log UFC/g)	Contagem de Psicrotróficos (log UFC/g)
INÍCIO					
6	< 1,0	Incontável	< 1,00	< 1,00	< 1,00
MEIO					
6	< 1,0	4,0 \pm 0,0	< 1,00	< 1,00	< 1,00
FIM					
6	< 1,0	5,9 \pm 0,0	< 1,00	< 1,00	< 1,00

Células a verde: resultados satisfatórios; células a vermelho: resultados não satisfatórios; célula a amarelo: resultado questionável.



**Cremoso Nata-Caramelo
(MEIO)**
 Diluição 10⁻¹
 6º Dia de Armazenamento

Figura 4.2: Aspeto das placas de microrganismos totais a 30°C obtidas com as amostras de Cremoso Nata-Caramelo.

De acordo com a **tabela 4.4**, relativa à sobremesa Cremoso Chocolate, na fase INÍCIO houve 100% de resultados satisfatórios para as *Enterobacteriaceae* a 37°C. Enquanto que, para os microrganismos totais a 30°C, nesta fase, houve 66,67% de resultados satisfatórios e 33,33% de resultados questionáveis. Na fase MEIO, obteve-se 66,67% de resultados satisfatórios e 33,33% de resultados questionáveis para as *Enterobacteriaceae* a 37°C. Para os microrganismos totais a 30°C, nesta fase, obteve-se 66,67% de resultados satisfatórios e 33,33% de resultados não satisfatórios. Na última fase (FIM), teve-se 100% de resultados satisfatórios para as *Enterobacteriaceae* a 37°C e em termos de resultados para os microrganismos totais a 30°C, 66,67% de resultados satisfatórios e 33,33% de resultados não satisfatórios. Em todas as fases de produção verificou-se 100% de resultados satisfatórios para as leveduras e bolores.

Relativamente à **tabela 4.5**, referente ao Cremoso Nata-Caramelo, em todas as fases, houve 100% de resultados satisfatórios nos bolores, leveduras e nas *Enterobacteriaceae* a 37°C. Relativamente aos microrganismos totais a 30°C, nas fases INÍCIO e FIM, teve-se 100% de resultados não satisfatórios. Enquanto que na fase MEIO, se obtiveram 100% de resultados questionáveis.

Na fase INÍCIO do Cremoso Chocolate, em relação aos microrganismos totais a 30°C, existe um resultado questionável, sendo que este se encontra no limiar entre o satisfatório e o questionável. Uma possível explicação para haver este resultado, pode ter sido a contaminação por parte da embalagem ou por esta não ter sido bem selada. Na fase MEIO e na fase FIM, verificaram-se dois resultados não satisfatórios entre vários resultados satisfatórios. Este resultado poderá também indiciar que houve alguma contaminação das embalagens; ou falhas na sua selagem, que tenha permitido a sua posterior contaminação. Os resultados sugerem a necessidade de efetuar um melhor controlo das embalagens.

De acordo com a **tabela 4.5**, nas fases INICIO e FIM de produção do Cremoso Nata-Caramelo, desde a primeira análise houve resultados não satisfatórios de microrganismos totais a 30°C, enquanto que na fase MEIO o resultado foi questionável, sendo que se encontra no limiar entre o questionável e o não satisfatório. Uma possível explicação para tal acontecimento, pode advir do facto de as matérias-primas estarem contaminadas; da má higienização do equipamento; da ocorrência de contaminações cruzadas; da contaminação proveniente dos materiais de embalagem ou por estas estarem mal seladas.

Ao longo do tempo de armazenamento, verificaram-se alterações na aparência, com o aparecimento de pequenas “bolhas”, em todas as fases de produção (ver **figura AIII.4** do **Anexo III**). Este fator é indicativo de deterioração, visto que pode estar relacionado com o crescimento microbiano. As atividades metabólicas dos microrganismos fazem com que haja produção de compostos voláteis e de ácidos orgânicos, nomeadamente do ácido láctico e do ácido succínico, assim provocando alterações ao nível da aparência, da formação de sabores e de odores desagradáveis e modificações de pH (principalmente, o fenómeno de acidificação, devido ao consumo de lactose por parte dos microrganismos), nas sobremesas lácteas, enquanto os compostos voláteis caracterizam as bactérias que estão envolvidas na deterioração das sobremesas lácteas (Leal, 2019; Techer et al., 2020).

Um dos ingredientes da sobremesa Cremoso Nata-Caramelo é a nata. Segundo estudos realizados por Albino, (2018) com natas que foram armazenadas a diferentes temperaturas (5°C, 25°C e 35°C), concluiu-se que o desenvolvimento de microrganismos a 30°C à temperatura de 5°C foi aumentando exponencialmente ao longo do tempo de armazenamento. Através destes dados, pode-se deduzir que este ingrediente pode ter proporcionado o desenvolvimento destes microrganismos na sobremesa, logo no início. Este ingrediente é um ótimo meio para o crescimento de bactérias, devido ao facto de ter um alto índice de nutrientes, possui uma elevada atividade de água e um pH perto do neutro.

O Cremoso Chocolate também tem nata na sua constituição mas apresentou melhores resultados. No entanto, o Cremoso Nata-Caramelo foi fabricado com uma temperatura menos elevada entre 87 - 95°C durante 15 minutos, enquanto que, o Cremoso Chocolate foi produzido a 100°C, durante 30 minutos. Esta diferença no binómio tempo/temperatura pode explicar os piores resultados obtidos com o Cremoso Nata-Caramelo.

Relativamente a todos os outros microrganismos pesquisados todos os resultados foram satisfatórios.

Em suma, o Cremoso Chocolate foi a sobremesa que aguentou mais tempo, por comparação com o Cremoso Nata-Caramelo. O Cremoso Nata-Caramelo, apresentou contaminações com microrganismos totais em todas as fases. Logo, após a realização de uma análise a cada fase de

produção desta sobremesa láctea, verificou-se que esta produção se mostrou ineficaz e não garantiu o tempo de vida útil estipulado (três meses), o que significa que deve haver alterações a nível da preparação, do embalamento e da formulação desta sobremesa.

4.2) Avaliação Físico-Química

Para se estudar a evolução físico-química de todas as fases de cada uma das sobremesas, fez-se a avaliação aos fatores pH (*subcapítulo 4.2.1*) e cor (aos parâmetros L*, a*, b*, variação total de cor (ΔE), Ângulo de Hue e Chroma (C*)) (*subcapítulo 4.2.2*), ao longo do tempo de armazenamento.

4.2.1) pH

O parâmetro pH está diretamente relacionado com a quantidade de iões de hidrogénio existentes numa solução, pelo que quanto maior for a concentração de iões hidrogénio, menor será o valor de pH e, conseqüentemente, maior será a acidez do alimento (Baptista & Venâncio, 2003; Pereira, 2016).

4.2.1.1) Pudim Zero Flan & Pudim Zero Chocolate

A *tabela 4.6* mostra o valor de pH ao longo do tempo de armazenamento dos Pudins Zero Flan e Zero Chocolate.

Tabela 4.6: Valores de pH ao longo do tempo de armazenamento para os Pudins Zero Flan e Zero Chocolate nas diversas fases de produção. Os resultados encontram-se representados pelos valores médios \pm desvio padrão.

Pudin Zero Flan	
Tempo de Armazenamento (dias)	pH
INÍCIO	
5	6,67 \pm 0,08
40	6,74 \pm 0,07
FIM	
5	6,72 \pm 0,08
130	6,62 \pm 0,08
Pudin Zero Chocolate	
Tempo de Armazenamento (dias)	pH
FIM	
5	6,40 \pm 0,02
94	6,41 \pm 0,08

Todos os valores de pH para Pudim Zero Flan, independentemente da fase de produção, se encontraram entre 6,62 e 6,64, ou seja o pH manteve-se aproximadamente constante durante todo o ensaio. Assim, o crescimento de mesófilos a um nível não satisfatório que se registou na amostra FIM

no dia 130, não se traduziu num abaixamento significativo do pH. O Pudim Zero Chocolate registou um valor de pH ligeiramente inferior ao Pudim Zero Flan, sendo, igualmente um valor de pH perto da neutralidade. A diferença de pH entre o Pudim Zero Flan e o Pudim Zero Chocolate deverá resultar dos diferentes ingredientes que estas duas formulações contêm.

4.2.1.2) Cremoso Chocolate & Cremoso Nata-Caramelo

A **tabela 4.7** apresenta os valores do pH, em todas as fases de produção, nas sobremesas Cremoso Chocolate e Cremoso Nata-Caramelo, ao longo do tempo de armazenamento.

Tabela 4.7: Valores de pH ao longo do tempo de armazenamento para o Cremoso Chocolate e Cremoso Nata-Caramelo, nas diversas fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM). Os resultados encontram-se representados pelos valores médios \pm desvio padrão.

Cremoso Chocolate	
Tempo de Armazenamento (dias)	pH
INÍCIO	
2	6,37 \pm 0,10
97	6,19 \pm 0,04
MEIO	
2	6,11 \pm 0,09
97	6,18 \pm 0,04
FIM	
2	6,20 \pm 0,09
97	6,25 \pm 0,04
Cremoso Nata Caramelo	
Tempo de Armazenamento (dias)	pH
INÍCIO	
27	6,27 \pm 0,03
38	6,32 \pm 0,01
45	6,27 \pm 0,05
MEIO	
27	6,32 \pm 0,03
31	6,25 \pm 0,06
38	6,33 \pm 0,01
45	6,34 \pm 0,05
FIM	
27	6,32 \pm 0,03
31	6,33 \pm 0,06
38	6,34 \pm 0,01
45	6,37 \pm 0,05

Tal como verificado nos pudins, também os valores de pH para os cremosos, independentemente da fase de produção, se mantiveram aproximadamente constantes durante todo o ensaio. Assim, o crescimento de mesófilos a um nível não satisfatório que se registou no Cremoso Nata-Caramelo e em algumas amostras do Cremoso Chocolate, não se traduziu num abaixamento significativo do pH. Assim, também no caso dos cremosos é possível verificar a estabilidade deste parâmetro durante todo o

ensaio (até aos 90 dias no caso do Cremoso Chocolate e até aos 45 dias no caso do Cremoso Nata-Caramelo).

4.2.2) Cor

4.2.2.1) Pudim Zero Flan & Pudim Zero Chocolate

As tabelas seguintes (*tabela 4.8 e 4.9*) dizem respeito às variações dos parâmetros da cor do Pudim Zero Flan e do Pudim Zero Chocolate, respetivamente, ao longo do tempo de armazenamento, em todas as fases de produção.

Tabela 4.8: Variação dos parâmetros da cor L*, a*, b*, ΔE, Ângulo de Hue e Chroma (C*) do Pudim Zero Flan, ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM. Os resultados encontram-se representados pelos valores médios ± desvio padrão.

Tempo de Armazenamento (dias)	Parâmetros da Cor					
	L*	a*	b*	ΔE	Ângulo de Hue	C*
INÍCIO						
2	56,34±1,06 ^a	- 4,08±0,20 ^a	19,65±0,74 ^a		101,73±0,32 ^b	20,07±0,76 ^a
47	65,79±,68 ^b	- 4,41±0,29 ^a	25,26±0,48 ^b	11,00±1,24 ^a	99,90 ± 0,48 ^a	25,65±0,52 ^b
54	67,90±4,37 ^b	- 4,21±0,45 ^a	26,47±1,75 ^b	13,44±3,81 ^a	99,03 ± 0,35 ^a	26,80±1,80 ^b
MEIO						
2	58,04±1,24 ^a	- 3,95±0,38 ^a	22,25±0,49 ^a		100,06±0,76 ^a	22,60 ± 0,55 ^a
47	64,53±3,38 ^b	- 4,40±0,24 ^a	25,23±1,60 ^b	7,16±2,49 ^a	99,90±0,11 ^a	25,61 ± 1,62 ^a
54	66,77±4,91 ^b	- 3,94±0,09 ^a	25,82±2,56 ^b	9,46±4,55 ^a	98,73 ± 1,06 ^a	26,12 ± 2,51 ^a
FIM						
2	56,90±1,63 ^a	- 3,61±0,29 ^a	21,54± 0,72 ^a		99,49±0,48 ^a	21,84±0,74 ^a
47	64,97±3,75 ^b	- 4,08±0,34 ^a	25,11±1,43 ^b	8,84±4,48 ^a	99,22±0,55 ^a	25,44±1,45 ^b

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

Tabela 4.9: Variação dos parâmetros da cor L*, a*, b*, ΔE, Ângulo de Hue e Chroma (C*) do Pudim Zero Chocolate, ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM. Os resultados encontram-se representados pelos valores médios ± desvio padrão.

Tempo de Armazenamento (dias)	Parâmetros da Cor					
	L*	a*	b*	ΔE	Ângulo de Hue	C*
INÍCIO						
2	28,48±1,18 ^a	3,60±1,60 ^a	3,30±1,82 ^a		41,59±2,93 ^a	4,89±2,41 ^a
21	28,28±0,35 ^a	5,71±0,03 ^a	5,76±0,06 ^a	3,36±2,45 ^a	45,23±0,21 ^a	8,11±0,06 ^a
33	29,35±0,45 ^a	5,44±0,60 ^a	5,55±0,77 ^a	3,41±1,82 ^a	45,52±0,87 ^a	7,77±0,96 ^a
MEIO						
2	28,50±1,93 ^a	4,58±0,62 ^a	4,40±0,79 ^a		43,76±1,32 ^a	6,35±1,00 ^a
21	27,95±0,45 ^a	5,55±0,09 ^b	5,70±0,11 ^b	1,95±1,52 ^a	45,75±0,33 ^a	7,95±0,13 ^b
33	29,27±0,92 ^a	5,78±0,15 ^b	5,84±0,22 ^b	2,78±0,81 ^a	45,29±0,31 ^a	8,22±0,26 ^b
FIM						
2	27,38±0,91 ^a	4,66±0,46 ^a	4,59±0,57 ^a		44,51±0,77 ^a	6,54±0,73 ^a
21	27,78±1,36 ^a	5,38±0,31 ^{ab}	5,46±0,32 ^{ab}	1,43±0,16 ^a	45,42±0,07 ^a	7,67±0,45 ^{ab}
33	28,45±0,37 ^a	5,63±0,13 ^b	5,75±0,20 ^b	1,95±0,49 ^a	45,61±0,40 ^a	8,05±0,23 ^b

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

No Pudim Zero Flan, verifica-se, de um modo geral, uma tendência para que o produto se torne mais claro (aumento do valor de L^*) e com uma tonalidade mais amarela (aumento do valor de b^*) (Wojdyło et al., 2009; Rebelo, 2017). Os valores de ΔE foram sempre superiores a três, isso significa que as alterações de cor poderão ser percebidas a olho nu (Torbica et al., 2016). Em todas as fases, o Ângulo de Hue ou diminui ao longo do tempo de armazenamento (INÍCIO), com a tonalidade a acentuar-se mais perto do amarelo (90°) (Konica Minolta, b) 2020) ou não variou de forma significativa (MEIO e FIM). A cromaticidade (C^*) também mostrou uma tendência para aumentar durante o tempo de vida útil do Pudim Zero Flan, o que significa que a cor se tornou mais forte e brilhante (Mohammadi et al., 2008; Rebelo, 2017).

Relativamente ao Pudim Zero Chocolate, verificou-se uma tendência para o aumento da tonalidade vermelha (aumento do valor de a^*) e amarela (aumento dos valores de b^*) (Wojdyło et al., 2009; Rebelo, 2017). A variação total de cor foi inferior a três ou muito próxima de três, pelo que é difícil que esta variação possa ser perceptível pelo olho humano (Torbica et al., 2016). Não se verificaram variações significativas no valor de Ângulo de Hue. Este valor encontra-se na zona acastanhada (Konica Minolta, b) 2020). Em termos do parâmetro Chroma, verificou-se uma tendência para o seu aumento ao longo do tempo, o que significa que a cor tende a tornar-se mais forte e brilhante (Mohammadi et al., 2008; Rebelo, 2017).

Através de estudos realizados por De Oliveira et al., (2003) com pudins dietéticos de chocolate, os valores do Ângulo de Hue determinados apresentam resultados semelhantes aos valores determinados em todas as fases do Pudim Zero Chocolate.

A cor pode alterar-se ao longo do tempo de armazenamento, devido às mudanças microbiológicas e físico-químicas que ocorrem no alimento (Da Silva, 2017). No *paper* de Ziyaina et al., (2019) afirma-se que à medida que existe desenvolvimento de microrganismos no leite, maior será o valor do ΔE . Assim, para algumas das amostras, nomeadamente para a fase MEIO do Pudim Zero Flan e para todas as fases do Pudim Zero Chocolate, o crescimento microbiano pode relacionar-se com as alterações da cor. No entanto, houve amostras em que não se detetou crescimento microbiológico mas nas quais se verificaram alterações na cor, o que pode ser explicado pela ocorrência de reações químicas entre os componentes das amostras ou pela instabilidade por parte dos pigmentos.

A temperatura é um fator determinante para a alteração da cor, porque este processo acelera o efeito de degradação química do alimento. Após um tratamento térmico, ocorrem alterações ao nível da estrutura dos corantes, pelo que afetam a sua aparência visual e as suas características espectrais (Guiménez et al., 2015). O Pudim Zero Flan, na sua constituição, contém o corante curcumina. A curcumina é sensível ao tratamento térmico, pois este corante é instável a variações de pH, a agentes oxidantes, a mudanças de temperatura e é pouco solúvel em água (Giménez et al., 2015; Silva et al., 2015). Esta instabilidade ao tratamento térmico pode ter provocado uma alteração na estrutura deste corante e, conseqüentemente, uma variação na cor ao longo do tempo de armazenamento.

4.2.2.2) Cremoso Chocolate & Cremoso Nata-Caramelo

As **tabelas 4.10** e **4.11** apresentam os valores dos parâmetros L^* , a^* , b^* , ΔE , Ângulo de Hue e Chroma nos Cremosos Chocolate e Nata-Caramelo ao longo do tempo de vida útil.

Tabela 4.10: Variação dos parâmetros da cor L^* , a^* , b^* , ΔE , Ângulo de Hue e Chroma (C^*) do Cremoso Chocolate, ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM. Os resultados encontram-se representados pelos valores médios \pm desvio padrão.

Tempo de Armazenamento (dias)	Parâmetros da Cor					
	L^*	a^*	b^*	ΔE	Ângulo de Hue	C^*
INÍCIO						
3	25,41 \pm 1,56 ^a	5,99 \pm 0,40 ^a	5,40 \pm 0,45 ^a		42,02 \pm 0,53 ^a	8,06 \pm 0,60 ^a
14	28,73 \pm 0,80 ^b	6,71 \pm 0,47 ^a	6,19 \pm 0,43 ^a	3,50 \pm 0,79	42,71 \pm 0,02 ^a	9,13 \pm 0,63 ^a
MEIO						
3	25,79 \pm 0,69 ^a	6,02 \pm 0,61 ^a	5,39 \pm 0,71 ^a		41,75 \pm 0,96 ^a	8,08 \pm 0,92 ^a
14	29,23 \pm 1,36 ^b	6,85 \pm 0,22 ^a	6,27 \pm 0,21 ^a	3,71 \pm 0,97	42,50 \pm 0,22 ^a	9,29 \pm 0,31 ^a
FIM						
3	26,41 \pm 0,95 ^a	6,12 \pm 0,24 ^a	5,51 \pm 0,26 ^a		42,03 \pm 0,53 ^a	8,23 \pm 0,35 ^a
14	27,49 \pm 2,80 ^a	6,51 \pm 0,90 ^a	5,88 \pm 1,03 ^a	3,37 \pm 1,00	41,99 \pm 1,12 ^a	8,77 \pm 1,35 ^a

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

Tabela 4.11: Variação dos parâmetros da cor L^* , a^* , b^* , ΔE , Ângulo de Hue e Chroma (C^*) do Cremoso Nata-Caramelo, ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM. Os resultados encontram-se representados pelos valores médios \pm desvio padrão.

Tempo de Armazenamento (dias)	Parâmetros da Cor					
	L^*	a^*	b^*	ΔE	Ângulo de Hue	C^*
INÍCIO						
3	46,77 \pm 4,07 ^a	6,67 \pm 0,84 ^a	16,41 \pm 2,13 ^a		67,87 \pm 0,10 ^b	17,71 \pm 2,29 ^a
31	53,62 \pm 1,75 ^b	7,85 \pm 0,33 ^{ab}	19,31 \pm 0,60 ^{ab}	7,55 \pm 4,39 ^a	67,88 \pm 0,20 ^{ab}	20,85 \pm 0,68 ^{ab}
38	53,35 \pm 1,55 ^b	8,59 \pm 0,21 ^b	19,59 \pm 0,46 ^b	7,59 \pm 6,22 ^a	66,31 \pm 0,05 ^a	21,39 \pm 0,46 ^b
45	56,75 \pm 1,21 ^b	9,05 \pm 0,39 ^b	20,94 \pm 0,45 ^b	11,23 \pm 5,07 ^a	66,64 \pm 0,49 ^a	22,82 \pm 0,56 ^b
MEIO						
3	48,98 \pm 3,57 ^a	7,29 \pm 0,42 ^a	17,40 \pm 1,29 ^a		67,26 \pm 0,58 ^a	18,86 \pm 1,34 ^a
31	53,20 \pm 1,01 ^{ab}	8,29 \pm 0,43 ^{ab}	19,24 \pm 0,77 ^{ab}	4,80 \pm 2,58 ^a	66,69 \pm 0,28 ^a	20,95 \pm 0,88 ^{ab}
38	58,09 \pm 4,53 ^b	9,16 \pm 0,56 ^b	20,84 \pm 1,71 ^b	9,92 \pm 4,11 ^a	66,25 \pm 0,49 ^a	22,77 \pm 1,79 ^b
45	57,04 \pm 1,25 ^b	8,92 \pm 0,22 ^b	20,90 \pm 0,45 ^b	8,97 \pm 5,03 ^a	66,89 \pm 0,38 ^a	22,73 \pm 0,47 ^b
FIM						
3	49,88 \pm 1,38 ^a	7,29 \pm 0,20 ^a	17,56 \pm 0,53 ^a		67,45 \pm 0,15 ^{ab}	19,01 \pm 0,56 ^a
31	56,91 \pm 1,28 ^b	8,24 \pm 0,09 ^b	20,84 \pm 0,49 ^b	7,83 \pm 1,53 ^a	68,30 \pm 0,83 ^b	22,41 \pm 0,43 ^b
38	58,87 \pm 1,46 ^b	9,33 \pm 0,32 ^c	21,57 \pm 0,65 ^b	10,0 \pm 1,40 ^a	66,60 \pm 0,10 ^a	23,50 \pm 0,72 ^b
45	58,00 \pm 0,44 ^b	9,35 \pm 0,21 ^c	21,30 \pm 0,32 ^b	9,20 \pm 0,85 ^a	66,29 \pm 0,17 ^a	23,26 \pm 0,38 ^b

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

No Cremoso Chocolate, verificou-se, de um modo geral, uma tendência para que o produto se tornasse mais claro (aumento do valor de L^*), mas sem se verificarem alterações nos valores de a^* e b^* , o que indica ausência de variação entre as tonalidades verde e vermelha e azul e amarela, respetivamente (Wojdyło et al., 2009; Rebelo, 2017). Os valores de ΔE foram sempre superiores mas muito próximos de três, isso significa que as alterações de cor dificilmente poderão ser percebidas a

olho nu (Torbica et al., 2016). Em todas as fases, o Ângulo de Hue e a cromaticidade (C^*) não se alteraram de modo significativo ao longo do armazenamento.

Para o Cremoso Nata-Caramelo, verificou-se uma maior variação da cor, com tendência para que o produto se torne mais claro (aumento do valor de L^*) e com uma tonalidade mais deslocada para o vermelho (aumento do valor de a^*) e para o amarelo (aumento do valor de b^*). Os valores de ΔE foram bastante superiores a três, o que indica que as alterações de cor poderão ser facilmente percebidas a olho nu (Torbica et al., 2016). Os valores de Ângulo de Hue, apresentaram uma tendência para diminuir ao longo do tempo de armazenamento, e encontraram-se na zona do creme (Konica Minolta, b) 2020). O parâmetro Chroma aumentou ao longo do tempo, indicando que a cor no final era mais forte e brilhante (Mohammadi et al., 2008; Rebelo, 2017).

Como já se explicou no subcapítulo acima, o crescimento microbiano e as mudanças físico-químicas podem levar à alteração da cor das sobremesas lácteas, ao longo do tempo de armazenamento (Da Silva, 2017). Devido a isto, é possível explicar a alteração da cor, em todas as fases do Cremoso Nata-Caramelo e da fase FIM do Cremoso Chocolate, no dia catorze de armazenamento. Nas análises onde não se verificou contaminação microbiana, mas onde existiram alterações nos valores dos parâmetros da cor, este facto pode ser justificado pela instabilidade dos pigmentos ou pela ocorrência de reações químicas entre os compostos da amostra.

O Cremoso Nata-Caramelo contém, na sua constituição, o corante curcumina que, conforme já referido é sensível, a mudanças de temperatura, a agentes oxidantes e tem uma baixa solubilidade na água (Giménez et al., 2015; Silva et al., 2015). Como esta sobremesa foi sujeita a um tratamento térmico, isso pode ter potenciado uma alteração na estrutura deste corante e, assim, provocar uma alteração na cor durante o tempo de vida útil da sobremesa láctea.

4.3) Avaliação Sensorial

Procedeu-se à avaliação sensorial, ao longo do tempo de armazenamento, em cada uma das fases, de cada sobremesa. Estudou-se em termos de Sabor, Aparência, Cor, Doçura e Textura. No final, deu-se uma Classificação Geral a cada fase da sobremesa.

4.3.1) Pudim Zero Flan & Pudim Zero Chocolate

As **tabelas 4.12** e **4.13** apresentam os resultados das avaliações dos parâmetros sensoriais (Sabor, Aspeto, Cor, Doçura e Textura e, no final, uma Classificação Geral), no Pudim Zero Flan e Pudim Zero Chocolate.

Tabela 4.12: Avaliação dos parâmetros sensoriais (Aspeto, Cor, Textura, Sabor, Doçura e, no final, uma Classificação Geral), ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO e FIM do Pudim Zero Flan. Os resultados encontram-se representados pelos valores médios \pm desvio padrão.

Tempo de Armazenamento (dias)	Parâmetros Sensoriais					
	Aspeto	Cor	Textura	Sabor	Doçura	Classificação Geral
INÍCIO						
5	4,3 \pm 0,8 ^a	4,7 \pm 0,8 ^a	4,7 \pm 0,5 ^a	4,3 \pm 0,8 ^b	3,3 \pm 0,5 ^a	4,2 \pm 0,8 ^b
40	3,7 \pm 0,8 ^a	4,4 \pm 0,8 ^a	3,5 \pm 1,0 ^a	2,8 \pm 0,4 ^a	3,0 \pm 0,6 ^a	3,2 \pm 0,3 ^a
FIM						
31	4,2 \pm 1,3 ^a	4,2 \pm 1,1 ^a	4,6 \pm 0,9 ^a	3,6 \pm 1,1 ^b	3,0 \pm 0,7 ^a	3,9 \pm 0,9 ^b

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

Tabela 4.13: Avaliação dos parâmetros sensoriais (Aspeto, Cor, Textura, Sabor, Doçura e, no final, uma Classificação Geral), ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM do Pudim Zero Chocolate. Os resultados encontram-se representados pelos valores médios \pm desvio padrão.

Tempo de Armazenamento (dias)	Parâmetros Sensoriais					
	Aspeto	Cor	Textura	Sabor	Doçura	Classificação Geral
INÍCIO						
5	4,6 \pm 0,5 ^a	4,6 \pm 0,5 ^a	3,6 \pm 0,9 ^a	3,4 \pm 1,1 ^a	3,6 \pm 0,5 ^a	3,8 \pm 0,7 ^a
MEIO						
5	5,0 \pm 0,1 ^a	4,3 \pm 1,0 ^a	3,8 \pm 1,0 ^a	3,5 \pm 1,0 ^a	3,3 \pm 1,0 ^a	3,8 \pm 1,0 ^a
FIM						
5	5,0 \pm 0,1 ^a	4,3 \pm 1,0 ^a	3,8 \pm 1,0 ^a	3,5 \pm 1,0 ^a	3,3 \pm 1,0 ^a	3,8 \pm 1,0 ^a

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

Relativamente ao Pudim Zero Flan (INÍCIO), apenas se verificaram diferenças significativas entre o “Sabor”, que diminuiu entre os dias 5 e 40 e a “Classificação Geral” que diminuiu, igualmente entre os dias 5 e 40. Com estas análises, verificou-se que as características organolépticas se degradaram a partir dos 40 dias de armazenamento, pois houve uma diminuição do sabor que terá contribuído para a diminuição da “Classificação Geral”. O parâmetro “Doçura” tem uma escala diferente, relativamente aos outros parâmetros. Por isso, segundo a escala da “Doçura”, estes valores encontram-se no nível “Gosto mesmo”, ou seja, apesar da pontuação ser mais baixa do que a atribuída aos outros parâmetros, o valor atribuído corresponde ao valor mais elevado da escala da “Doçura”.

A diminuição da pontuação atribuída ao sabor do Pudim Zero Flan a partir do 30º dia de armazenamento pode estar relacionada com os edulcorantes sucralose e acesulfame-K. Estes edulcorantes promovem alterações no sabor e na cor das sobremesas, ao longo do tempo, o que leva à diminuição dos valores destes parâmetros e, conseqüentemente, à atribuição de uma menor pontuação por parte do painel de provadores (Júnior et al., 2016). Outra explicação para que houvesse uma descida ao longo do tempo do parâmetro “Sabor” pode ter a ver com as reações de hidrólise e de oxidação que podem ocorrer ao longo do armazenamento (Young & O’Sullivan, 2011).

Não se fez nenhuma análise sensorial ao Pudim Zero Flan (MEIO) porque desde a primeira análise microbiológica apresentou uma qualidade não satisfatória.

A análise sensorial para o Pudim Zero Chocolate só foi realizada no dia 5, uma vez que as análises microbiológicas mostraram que o produto se encontrava com uma qualidade não satisfatória logo ao décimo dia de armazenamento. A análise efetuada mostrou a inexistência de diferenças significativas nos atributos sensoriais do pudim nas diversas fases de produção (INÍCIO, MEIO e FIM).

4.3.2) Cremoso Chocolate

A **tabela 4.14** é referente à avaliação sensorial dos parâmetros: Aspeto, Cor, Textura, Sabor e Doçura, atribuindo-se no final uma Classificação Geral ao Cremoso Chocolate.

Tabela 4.14: Avaliação dos parâmetros sensoriais (Aspeto, Cor, Textura, Sabor, Doçura e, no final, uma Classificação Geral), ao longo do tempo de armazenamento, nas fases INÍCIO, MEIO e FIM do Cremoso Chocolate. Os resultados encontram-se representados pelos valores médios \pm desvio padrão.

Tempo de Armazenamento (dias)	Parâmetros Sensoriais					
	Aspeto	Cor	Textura	Sabor	Doçura	Classificação Geral
INÍCIO						
2	4,0 \pm 0,7 ^a	4,2 \pm 0,8 ^a	2,4 \pm 0,9 ^a	2,2 \pm 0,4 ^a	2,3 \pm 0,8 ^a	2,2 \pm 0,4 ^a
MEIO						
2	3,6 \pm 1,1 ^a	4,2 \pm 0,8 ^a	2,2 \pm 0,8 ^a	2,0 \pm 0,7 ^a	2,3 \pm 0,8 ^a	2,2 \pm 0,4 ^a
FIM						
2	4,2 \pm 0,8 ^a	4,3 \pm 0,8 ^a	2,5 \pm 0,8 ^a	2,7 \pm 0,8 ^a	2,4 \pm 0,5 ^a	2,7 \pm 0,8 ^a

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

A **tabela 4.14** mostra que em relação ao Cremoso Chocolate também não se verificaram diferenças significativas entre as pontuações dadas das diferentes fases da produção (INÍCIO, MEIO e FIM). O Cremoso Chocolate teve pontuações muito baixas no parâmetro da "Textura". Isto pode ser explicado pelo facto de nesta sobremesa terem ficado no produto final grumos da farinha de aveia. Este ingrediente não foi posto no local das matérias-primas, mas sim diretamente, no reator. Esta sobremesa teve igualmente pontuações muito baixas no atributo "Sabor", pelo que se considerou ser necessário modificar a formulação e não seguir com as análises sensoriais.

Não se fez nenhuma análise sensorial ao Cremoso Nata-Caramelo, uma vez que as análises microbiológicas mostraram que o produto se encontrava com uma qualidade não satisfatória logo ao sexto dia de armazenamento.

5) Conclusão

Nesta dissertação visou-se estudar se os pudins (Pudim Zero Flan e Pudim Zero Chocolate) e os cremosos (Cremoso Chocolate e Cremoso Nata-Caramelo) mantinham as condições apropriadas ao longo do respetivo tempo de armazenamento até ao prazo de validade estabelecido inicialmente, que era de três meses. As sobremesas que obtiveram melhores resultados durante este período foram o Cremoso Chocolate, em todas as fases, que não teve sinais de deterioração até à data de validade estipulada pela empresa e o Pudim Zero Flan (FIM) que manteve a sua estabilidade microbiológica até ao dia 63.

O trabalho desenvolvido permitiu identificar a ausência de manutenção da higiene do processo ao longo de toda a produção, com diferenças na contaminação microbiológica dos produtos recolhidos nas diferentes fases de processamento (INÍCIO, MEIO e FIM). Para além disto, algumas formulações, especialmente o Pudim Zero Chocolate e o Cremoso Nata-Caramelo e a fase MEIO do Pudim Zero Flan, apresentaram análises não satisfatórias ao fim de poucos dias de armazenamento. Este problema pode evidenciar a necessidade de melhorar as operações de limpeza do reator, bicos de enchimento ou efetuar um maior controlo das embalagens e das matérias primas. Outra possibilidade será mudar as formulações dos produtos e/ou o modo de processamento, de forma a evitar possíveis contaminações. Por exemplo, na formulação poderiam ser adicionados conservantes. No modo de processamento poder-se-ia aumentar a temperatura sem que se alterassem as características organolépticas pretendidas.

A necessidade de reformulação foi também evidenciada no Cremoso Chocolate, neste caso devido a este ter apresentado uma baixa pontuação na análise sensorial, em grande parte devido à baixa pontuação atribuída à sua textura. Esta baixa pontuação pode estar relacionada com a fraca homogeneização da farinha de aveia, o que originou a presença de grumos.

Durante a realização desta dissertação ocorreram situações que produziram algumas limitações, e que se relacionaram com a pandemia provocada pelo vírus SARS-CoV-2. Devido a essa situação não foi possível realizar todo o plano de análises previsto e não houve possibilidade de acompanhar o desenvolvimento das novas formulações e das produções efetuadas com alterações de processo.

Concluindo, o trabalho realizado evidenciou a necessidade de se proceder a reformulações destas sobremesas e mudar alguns parâmetros no modo de processamento, tendo em consideração às práticas de segurança e higiene adequadas. Quando este processo estiver otimizado, será possível inovar e desenvolver a partir destes produtos novas referências. Por exemplo pode-se estudar a colocação de uma espuma no topo destas sobremesas como, por exemplo, o *chantilly*, ou criar cremosos e pudins de chocolate com outros tipos de chocolate, como, por exemplo, chocolate branco, chocolate de leite, chocolate negro, entre outros. Também se poderia desenvolver um pudim *duo* que contivesse o Pudim Zero Flan e o Pudim Zero Chocolate ou formular uma única sobremesa com os dois cremosos: o Cremoso Chocolate e o Cremoso Nata-Caramelo, uma sobremesa *duo*.

6) Referências Bibliográficas

- Aceña, L., Mestres, M., Busto, O. & Boqué, R. (2017). *Sensory Analysis. Food Authentication: Management, Analysis and Regulation*. C. A. Georgiou & G. P. Danezis (Eds.), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 547 pp. (ISBN 9781118810255). Consultado a: 02/05/2020. Disponível online em: https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-PT&as_sdt=0%2C5&q=Ace%C3%B1a%2C+L.%2C+Mestres%2C+M.%2C+Busto%2C+O.+%26+Boqu%C3%A9%2C+R.+%282017%29.+Sensory+Analysis.+Food+Authentication%3A+Management%2C+Analysis+and+Regulation.+C.+A.+Georgiou+%26+G.+P.+Danezis+%28Eds.%29%2C+John+Wiley+%26+Sons%2C+Ltd.%2C+Chichester%2C+UK%2C+547+pp.+%28ISBN+9781118810255%29.+&btnG=
- Acumedia. (2016). *DRBC Agar (7591)*. Consultado a: 02/04/2020. Disponível online em: https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10000/7591_pt_pi.pdf
- Acumedia. (2014). *Violet Red Bile Glucose Agar (7425)*. Consultado: 03/04/2020. Disponível online em: https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10000/7425_pt_pi.pdf
- Adami, S. F. (2016). *Alimentação e Nutrição Nos Ciclos Da Vida. 1ª Edição, Lajeado: Univates. [s.n.]*. (ISBN 978-85-8167-183-3). Consultado a: 01/06/2020. Disponível online em: <https://www.univates.br/editora-univates/publicacao/194>
- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008). *Food Microbiology. 3ª Edição, RSCPublishing. University of Surrey, Guildford, UK, 477 pp.* (ISBN 978-0-85404-284-5). Consultado a: 27/05/2020. Disponível online em: https://www.academia.edu/36453321/Food_Microbiology_Third_Edition
- Aditivos & Ingredientes. (2020). *O poder dos carotenoides*. Consultado a: 24/10/2020. Disponível online em: <https://aditivosingredientes.com.br/artigos/ingredientes-funcionais/o-poder-dos-carotenoides>
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M. & Ryan, A. (2008). *Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate: A Critical Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48 (9), 840 – 857*. Consultado a: 28/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- Akoy, E. O. M., Hörsten, D. V. & Luecke, W. (2008). *Drying Kinetics and Colour Change of Mango Slices as Affected by Drying Temperature and Time. Tropentag International Conference on “Competition for Resources in a Changing World: New Drive for Rural Development”, Hohenheim, Germany*. Consultado a: 07/07/2020. Disponível online em: https://www.tropentag.de/2008/abstracts/links/Akoy_1777cCsE.pdf
- Alamprese, C. & Mariotti, M. (2011). *Effects of different milk substitutes on pasting, rheological and textural properties of puddings. LWT – Food Science and Technology, 44 (10), 2019 – 2025*. Consultado a: 10/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.06.012>
- Albino, R. B. (2018). *Análise de Degradação de Produto Alimentício: Estudo da Vida de Prateleira. (Relatório Técnico/Científico de Bacharel em Engenharia Química, Universidade do Sul de Santa Catarina)*. Consultado a: 20/10/2020. Disponível online em: <https://www.riuni.unisul.br/handle/12345/5232>
- Alfen, N. K. V. (2014). *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. Academic Press, London, UK, 602 pp.* (ISBN 978-0-444-52512-3). Consultado a: 27/08/2020. Disponível online em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=Y-VfAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Alfen,+N.+K.+V.+\(2014\).+Encyclopedia+of+Agriculture+and+Food+Systems.+Academic+Press,+London,+UK,+602+pp.+\(ISBN+978-0-444-52512-3\).+&ots=tBO6SdLE_d&sig=q-7e0X15f1kUTDdlr4M2GRpotu8#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=Y-VfAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Alfen,+N.+K.+V.+(2014).+Encyclopedia+of+Agriculture+and+Food+Systems.+Academic+Press,+London,+UK,+602+pp.+(ISBN+978-0-444-52512-3).+&ots=tBO6SdLE_d&sig=q-7e0X15f1kUTDdlr4M2GRpotu8#v=onepage&q&f=false)
- Alija, J. & Talens, C. (2013). *New concept of desserts with no added sugar. International Journal of Gastronomy and Food Science, 1 (2), 116 – 122*. Consultado a: 30/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2013.06.002>

Ambifood. (2016). *Notícias – O que é a Atividade da Água?*. Consultado a: 27/04/2020. Disponível online em: <https://www.ambifood.com/pt/noticias/o-que-e-a-atividade-da-agua/>

Armnianos, H. F. M., Abbaas, A. A., El-Leboudy, A. A. & El-ansary, M. A. (2017). *Sanitary Evaluation of Frozen Dessert Sold at Local Markets. Alexandria Journal of Veterinary Sciences, Vol. 54, 179 – 181.* Consultado a: 09/09/2020. Disponível online em: <https://www.alexjvs.com/fulltext/31-1503855144.pdf>

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 – 475.* Consultado a: 19/06/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1177%2F1082013211433070>

ASAEa. (2020). *Emulsionantes, estabilizadores, espessantes e gelificantes.* Consultado a: 19/10/2020. Disponível online em: <https://www.asae.gov.pt/wwwbase/acessibilidade/aaaDefault.aspx?back=1&f=1&lws=1&mcna=0&inc=7232AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA&codigono=541054325545AAAAAAAAAAAA>

ASAEb. (2020). *Outros Aditivos.* Consultado a: 20/10/2020. Disponível online em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/aditivos-alimentares/outros-aditivos.aspx>

ASAEc. (2020). *Corantes.* Consultado a: 24/10/2020. Disponível online em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/aditivos-alimentares/corantes.aspx>

Associação Portuguesa dos Nutricionistas. (2016). *Conhecer o leite.* Consultado a: 14/10/2020. Disponível online em: https://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/Ebook_Conhecer_o_Leite_Final.pdf

Baptista, P & Linhares, M. (2005). *Higiene e Segurança Alimentar na Restauração – Volume I – Iniciação. 1ª Edição, Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, S.A., Guimarães, Portugal, 127 pp. (ISBN 972-99099-6-2).* Consultado a: 14/05/2020. Disponível online em: https://www.esac.pt/noronha/manuais/restaura%E7%E3o_VOL_1.pdf

Baptista, P. & Venâncio, A. (2003). *Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. 1ª Edição, Guimarães: Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, Lda., 109 pp. (ISBN 972-99099-3-8).* Consultado a: 14/02/2020. Disponível online em: https://www.esac.pt/noronha/manuais/manual_4_perigos.pdf

Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H. & Davies, A. (2011). *The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. ILSI Europe, Bruxelas, Bélgica, 52 pp. (ISBN 9789078637332).* Consultado a: 19/03/2020. Disponível online em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143006754>

Bertelsen, A. S., Mielby, L. A., Byrne, D. V. & Kidmose, U. (2020). *Ternary Cross-Modal Interactions between Sweetness, Aroma, and Viscosity in Different Beverage Matrices. Foods 2020, 9, 395.* Consultado a: 23/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.3390/foods9040395>

Bibi, F., Guillaume, C., Vena, A., Gontard, N., & Sorli, B. (2016). *Wheat gluten, a bio-polymer layer to monitor relative humidity in food packaging: Electric and dielectric characterization. Sensors and Actuators A: Physical, 247, 355 - 367.* Consultado a: 01/06/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.sna.2016.06.017>

BIOKARa. (2020). *Technical Data Sheet. Tryptone-Salt Broth.* Consultado a: 06/09/2020. Disponível online em: http://www.solabia.com/Produto_163,9/BIOKAR-Diagnostics/TRYPHONE-SALT-BROTH.html

BIOKARb. (2020). *Technical Data Sheet. Plate Count Agar (PCA).* Consultado a: 01/04/2020. Disponível online em: http://www.solabia.com/Produto_248,9/BIOKAR-Diagnostics/PLATE-COUNT-%20AGAR-PCA.html,

BIOKARc. (2020). *Technical Data Sheet. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)*. Consultado a: 02/04/2020. Disponível online em: http://www.solabia.com/Produto_282,9/BIOKAR-Diagnostics/DICHLORAN-ROSE-BENGAL-CHLORAMPHENICOL-DRBC-AGAR.html

BIOKARd. (2020). *Technical Data Sheet. VRBG Agar*. Consultado a: 03/04/2020. Disponível online em: http://www.solabia.com/Produto_160,9/BIOKAR-Diagnostics/VRBG-AGAR.html

Braz, C. B. P. (2017). *Prolongamento da vida útil do Queijo Fresco. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa)*. Consultado a: 30/04/2020. Disponível online em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/15848>

Buriti, F. C. A. & Saad, S. M. I. (2013). *Chilled Milk-based Desserts as Emerging Probiotic and Prebiotic Products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 54 (2), 139 – 150*. Consultado a: 06/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.605230>

Calvo, C. & Salvador, A. (2000). *Use of natural colorants in food gels. Influence of composition of gels on their colour and study of their stability during storage. Food Hydrocolloids, 14 (5), 439 – 443*. Consultado a: 14/04/2020. Disponível online em: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00023-0)

Campo, V. L., Kawano, D. F., Silva, D. B. D. & Carvalho, I. (2009). *Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. Carbohydrate Polymers, 77 (2), 167 – 180*. Consultado a: 22/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.020>

Candan, T. & Bagdath, A. (2017). *Use of Natural Antioxidants in Poultry Meat. CBU Journal of Science, 13 (2), 279 - 291*. Consultado a: 06/03/2020. Disponível online em: <https://dergipark.org.tr/en/pub/cbayarfbf/issue/29779/319752>

Cando, M. E. A. (2016). *Descriptive Sensory and Texture Profile Analysis of Woody Breast in Marinated Chicken. (Dissertação de Mestrado em Food Science and Technology, Texas A&M University)*. Consultado a: 01/08/2020. Disponível online em: <https://oaktrust.library.tamu.edu/handle/1969.1/157833>

Carvalho, M. L. A. dos S. (2014). *Avaliação de riscos emergentes: Caracterização e uso de Agentes Antimicrobianos Naturais. (Dissertação de Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto)*. Consultado a: 27/04/2020. Disponível online em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/78201/2/34144.pdf>

Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). *Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 41, 357 – 377*. Consultado a: 14/06/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016>

Choe, J.-H., Choi, M.-H. Rhee, M.-S. & Kim, B.-C. (2015). *Estimation of Sensory Pork Loin Tenderness Using Warner-Bratzler Shear Force and Texture Profile Analysis Measurements. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 29 (7), 1029 – 1036*. Consultado a: 22/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.5713%2Fajas.15.0482>

Codex Alimentarius Commission. (2016). *Standard for chocolate and chocolate products. CODEX STAN 87 – 1981*. Consultado a: 03/03/2020. Disponível online em: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B87-1981%252FCXS_087e.pdf

Codex Alimentarius Commission. (2015). *General Standard for Food Additives. CODEX STAN 192 – 1995*. Consultado a: 19/05/2020. Disponível online em: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B192-1995%252FCXS_192e.pdf

Codex Alimentarius Commission. (1999). *Code of hygienic practice for refrigerated packaged foods with extended shelf life*. CAC/RCP 46. Consultado a: 20/01/2020. Disponível online em: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXC%2B46-1999%252FCXP_046e.pdf

Comissão das Comunidades Europeias. (2001). *Relatório da Comissão relativo à ingestão de aditivos alimentares no âmbito do regime alimentar na União Europeia*. Consultado a: 26/10/2020. Disponível online em: <https://op.europa.eu/pt/publication-detail/-/publication/26105dba-6d8f-4515-a641-0e43fe3f5498/language-pt>

Condalab. (2020). *Medio Glucosa OF ISO Cat. 2150 Para la identificación de enterobacterias*. Consultado a: 23/04/2020. Disponível online em: https://www.condalab.com/int/en/dehydrated-culture-media/1345-5767-glucose-of-medium-iso.html#/2-formato-500_g

Corradini, M. G. & Peleg, M. (2007). *Shelf-life estimation from accelerated storage data*. *Trends in Food Science & Technology*, 18 (1), 37 – 47. Consultado a: 06/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.07.011>

Correia, C. R. M. (2018). *Red Velvet: Origem da Cor Vermelha do Bolo*. (Dissertação de Mestrado em Ciências Gastronómicas, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa). Consultado a: 18/05/2020. Disponível online em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/17839>

Cruz, R. M. S., Rico, B. P. M. & Vieira, M. C. (2019). *Food packaging and migration*. *Food Quality and Shelf Life*, 281 – 301. Consultado a: 20/06/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00009-4>

Curia, A., Aguerri, M., Langohr, K. & Hough, G. (2005). *Survival Analysis Applied to Sensory Shelf Life of Yogurts – I: Argentine Formulations*. *Journal of Food Science*, 70 (7), s442 – s445. Consultado a: 14/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11489.x>

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. Consultado a: 18/09/2020. Disponível online em: [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(01\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(01)00012-X)

Da Silva, L. G. P., Zardo, G., Perestelo, A. A., de Paula, L. C., Miyaki, S., Surita, L. M. A., Duarte, M. T. & Bonin, M. D. N. (2017). *Sistemas de Embalagens para Carnes*. Serviço Público Federal, Ministério da Educação, Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Consultado a: 06/05/2020. Disponível online em: <https://famez.ufms.br/files/2015/09/SISTEMAS-DE-EMBALAGENS-PARA-CARNES.pdf>

Da Silva, J. C. & Sa, D. M. A. T. (2020). *Desenvolvimento de sobremesa láctea cremosa utilizando pectina do albedo de maracujá amarelo (Passiflora edulis F. Flavicarpa) como estabilizante*. Ministério da Educação, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE, Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação – PRPI. Consultado a: 20/09/2020. Disponível online em: http://prpi.ifce.edu.br/nl/_lib/file/doc5986-Trabalho/relatorio%20sobremesajamiliafim-convertido.pdf

De Araújo, V. G., Arruda, M. D. O., Duarte, F. N. D., de Sousa, J. M. B., Lima, M. C., da Conceição, M. L., Schaffner, D. W. & de Souza, E. L. (2017). *Predicting and Modelling the Growth of Potentially Pathogenic Bacteria in Coalho Cheese*. *Journal of Food Protection*, 80 (7), 1172 – 1181. Consultado a: 08/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-523>

Decreto-Lei n.º 152/2017. *Altera o regime da qualidade da água para consumo humano, transpondo as Diretivas nos 2013/51/EURATOM e 2015/1787*. *Diário da República* n.º 235/2017, Série I de 2017-12-07. Consultado a: 30/06/2020. Disponível online em: <https://dre.pt/home/-/dre/114315242/details/maximized>

De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J. & Alvarez-Parrilla, E. (2019). *Phenolic Compounds. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, 253 - 271. Consultado a: 24/05/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>

De Noronha, J. F. (2006). *Análise Sensorial – Metodologia. (Material de apoio às aulas de Análise Sensorial, Escola Superior Agrária de Coimbra)*. Consultado a: 13/05/2020. Disponível online em: http://www.esac.pt/noronha/A.S/Apontamentos/sebenta_v_1_0.pdf

De Oliveira, A. P. V., Frasson, K., Yamashita, F. & Benassi, M. D. T. (2003). *Medida Instrumental de Cor em Sobremesas Lácteas de Chocolate: uma Técnica de Baixo Custo e Versátil Utilizando Câmara Digital. Brazilian Journal of Food Technology*, 6 (2), 191 – 196. Consultado a: 16/06/2020. Disponível online em: https://www.researchgate.net/publication/288028565_Medida_instrumental_de_cor_em_sobremesa_lacteas_de_Chocolate_uma_tecnica_de_baixo_custo_e_versatil_utilizando_camara_digital

De Souza, B. A., Pias, K. K. S., Braz, N. G. & Bezerra, A. S. (2019). *Aditivos Alimentares: Aspectos Tecnológicos e Impactos na Saúde Humana. Revista Contexto & Saúde, Editora Unijuí*, 19 (36), 5 – 13. Consultado a: 17/05/2020. Disponível online em: <https://revistas.unijui.edu.br/index.php/contextoesaude/article/view/7736>

De 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 de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina)*. Consultado a: 19/10/2020. Disponível online em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/176026>

Diretiva n.º 88/388/CEE do Conselho de 22 de Junho de 1988. Consultado a: 16/07/2020. Disponível online em: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/4f729209-04b9-42ac-a202-4487fad12882/language-pt>

Dos Santos, G. B., Brandão, F. Z., Ribeiro, L. D. S., Ferreira, A. L., Campos, M. M., Machado, F. S. & Carvalho, B. C. D. (2019). *Milk production and composition, food consumption, and energy balance of postpartum crossbred Holstein-Gir dairy cows fed two diets of different energy levels. Tropical Animal Health and Production*, 51, 65 – 71. Consultado a: 20/03/2020. Disponível online em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-018-1660-1>

Duarte, T. S., Silva, M. E. L., Araújo, J. C. M., Almeida, R. D. & Gusmão, T. A. S. (2019). *Perfil de textura de sobremesas lácteas com concentrado proteico de soro e diferentes tipos de estabilizantes/espessantes. Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 21 – 24 de Julho de 2019*. Consultado a: 16/08/2020. Disponível online em: <http://cobeqic2019.com.br/trabalhosfinais/ETA32.pdf>

Elias, M., Laranjo, M., Agulheiro-Santos, A. C. & Potes, M. E. (2019). *The Role of Salt on Food and Human Health. IntechOpen, Londres, UK, 122 pp.* (ISBN 978-1-78984-635-5). Consultado a: 19/05/2020. Disponível online em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=kk9DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA19&dq=Elias,+M.,+Laranjo,+M.,+Agulheiro-Santos,+A.+C.+%26+Potes,+M.+E.+\(2019\).+The+Role+of+Salt+on+Food+and+Human+Health.+IntechOpen,+Londres,+UK,+122+pp&ots=4rTVXd5RoL&sig=fTUY050i6ask9t2mQShaxbKHHpM#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=kk9DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA19&dq=Elias,+M.,+Laranjo,+M.,+Agulheiro-Santos,+A.+C.+%26+Potes,+M.+E.+(2019).+The+Role+of+Salt+on+Food+and+Human+Health.+IntechOpen,+Londres,+UK,+122+pp&ots=4rTVXd5RoL&sig=fTUY050i6ask9t2mQShaxbKHHpM#v=onepage&q&f=false)

Esbelin, J., Santos, T., & Hébraud, M. (2018). *Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face. Food Microbiology*, 69, 82 - 88. Consultado a: 01/06/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.017>

European Parliament & Council. (2011). *Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 Amending Annex II to Regulation (EC) No 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*. Consultado a: 15/06/2020. Disponível online em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32011R1129>

Fagundes, C., Moraes, K., Pérez-Gago, M. B., Palou, L., Maraschin, M., & Monteiro, A. R. (2015). *Effect of active modified atmosphere and cold storage on the postharvest quality of cherry tomatoes. Postharvest Biology and Technology*, 109, 73 – 81. Consultado a: 09/06/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.017>

Fang, T. J., Wei, Q.-K., Liao, C.-W., Hung, M.-J. & Wang, T.-H. (2003). *Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. International Journal of Food Microbiology*, 80 (3), 241 – 250. Consultado a: 02/10/2020. Disponível online em: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00172-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00172-1)

Fani, M. (2012). *Conservação de Alimentos por Aditivos Químicos. Food Ingredients Brasil*. Vol. XIV, (22), 35 – 42. Consultado a: 04/05/2020. Disponível online em: <https://www.revista-fi.com/>

FAO. (2016). *Traditional Microbiological Quality Control*. Consultado a: 03/09/2020. Disponível online em: <http://www.fao.org/docrep/003/t1768e/t1768e04.htm>

Ferreira, J. F. S. (2018). *Listeria monocytogenes em salada com frango pronta a consumir: Estudo da Vida Útil utilizado em Challenge Test. (Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa)*. Consultado a: 27/08/2020. Disponível online em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/15124>

Figueiredo, J. M., Fernandes, V., Limpo, V., Gonçalves, L., Pedrosa, F. & Diniz, C. (2001). *Guia técnico Sectorial-Indústria de Lacticínios. Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, Lisboa*. Consultado a: 21/03/2020. Disponível online em: https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-PT&as_sdt=0%2C5&q=Guia+t%C3%A9cnico+Sectorial-Ind%C3%BAstria+de+Lactic%C3%ADnios.+Instituto+Nacional+de+Engenharia+e+Tecnologia+Industrial%2C+Lisboa&btnG=

Francis, G. A., Gallone, A., Nychas, G. J., Sofos, J. N., Colelli, G., Amodio, M. L. & Spano, G. (2012). *Factors Affecting Quality and Safety of Fresh-Cut Produce. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52 (7), 595 – 610. Consultado a: 10/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.503685>

FSAI. (2019). *Guidance Note No. 18: Validation of Product Shelf-life (Revision 4). Food Safety Authority of Ireland*. Dublin: Ireland. Consultado a: 30/08/2020. Disponível online em: https://www.fsai.ie/publications_GN18_shelf-life

Galić, K. (2009). *A fresh perspective: looking at the shelf life of packaged food. Food Engineering & Ingredients*, 34, 17 – 19. Consultado a: 27/04/2020. Disponível online em: https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-PT&as_sdt=0%2C5&q=Gali%C4%87%2C+K.+%282009%29.+A+fresh+perspective%3A+looking+at+the+shelf+life+of+packaged+food.+Food+Engineering+%26+Ingredients%2C+34%2C+17-19.&btnG=

Gava, A. J., da Silva, C. A. B., & Frias, J. R. G. (2009). *Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações. Nobel Franquias S.A., São Paulo, Brasil, 505 pp. (ISBN 978-85-213-1382-3)*. Consultado a: 06/03/2020. Disponível online em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=mblqoh793j0C&oi=fnd&pg=PA23&dq=Gava,+A.+J.,+da+Silva,+C.+A.+B.,+%26+Frias,+J.+R.+G.+%282009%29.+Tecnologia+de+Alimentos:+Princ%C3%ADpios+e+Aplica%C3%A7%C3%B5es.+Nobel+Franquias+S.A.,+S%C3%A3o+Paulo,+Brasil,+505+pp&ots=ZlaApalFU0&sig=x1xRdpeAiBP7gVJ00A1Ly4mLXE#v=onepage&q&f=false>

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. Consultado a: 07/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0499-0>

Giménez, A., Ares, F. & Ares, G. (2012). *Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. Food Research International*, 49 (1), 311 – 325. Consultado a: 08/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.008>

Granato, D., Masson, M., & Freitas, R. (2010). *Stability studies and shelf life estimation of a soy-based dessert. Ciências e Tecnologia de Alimentos, 30 (3), 797 - 807*. Consultado a: 20/04/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1590/s0101-20612010000300036>

Guerra, A. F. (2016). *Métodos de contagem microbiana. Valença, 1ª Edição, 28 pp*. Consultado a: 21/03/2020. Disponível online em: <https://www.microbiologia-de-alimentos.com>

Han, L., Boehm, D., Amias, E., Milosavljević, V., Cullen, P. J., & Bourke, P. (2016). *Atmospheric cold plasma interactions with modified atmosphere packaging inducer gases for safe food preservation. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 38, 384 – 392*. Consultado a: 09/06/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.026>

Henriques, B. J. M. (a) (2014). *Relação entre higienização de manipuladores e superfícies e a contaminação do produto final em pequenas indústrias alimentares. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Alimentar, Universidade de Aveiro)*. Consultado a: 05/04/2020. Disponível online em: <https://ria.ua.pt/bitstream/10773/14200/1/Rela%C3%A7%C3%A3o%20entre%20a%20higieniza%C3%A7%C3%A3o%20de%20manipuladores%20e%20superf%C3%ACies%20e%20a%20contamina%C3%A7%C3%A3o%20do%20produto%20final%20em%20pequenas%20indústrias%20alimentares.pdf>

Henriques, A. F. F. (b) (2014). *Análise de um Processo Fermentativo para Desenvolvimento de um Produto Alimentar. (Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química, Escola Superior de Tecnologia de Tomar, Instituto Politécnico de Tomar)*. Consultado a: 17/05/2020. Disponível online em: <http://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/8305>

Henriques, A. R. B. C. D. S. (2008). *Avaliação da vida útil de refeições “cook-chill” e “cook-freeze”: indicadores microbiológicos, físico-químicos e sensoriais. (Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa)*. Consultado a: 27/04/2020. Disponível online em: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/492/1/capa.pdf>

Heymann, H. & Ebeler, S. E. (2016). *Rapid methods to analyze alcoholic beverages. Em Sensory and Instrumental Evaluation of Alcoholic Beverages. Elsevier, 84 - 104 pp*. Consultado a: 13/04/2020. Disponível online em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=p07pCAAQAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Rapid+methods+to+analyze+alcoholic+beverages.+Em+Sensory+and+Instrumental+Evaluation+of+Alcoholic+Beverages&ots=8vSKH8qzET&sig=aNb2c34CWE--1nF4nD8uSGiCt2Q#v=onepage&q=Rapid%20methods%20to%20analyze%20alcoholic%20beverages.%20Em%20Sensory%20and%20Instrumental%20Evaluation%20of%20Alcoholic%20Beverages&f=false>

Hough, G., & Garrita, L. (2012). *Methodology for sensory shelf-life estimation: A review. Journal of Sensory Studies, 27 (3), 137 - 147*. Consultado a: 20/04/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1111/j.1745-459x.2012.00383.x>

Hough, G. (2010). *Sensory Shelf Life Estimation of Food Products. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, EUA, 246 pp. (ISBN 978-1-4200-9294-3)*. Consultado a: 23/05/2020. Disponível online em: https://books.google.pt/books?id=wmm2kurjHywC&printsec=frontcover&dq=Sensory+Shelf+Life+Estimation+of+Food+Products&hl=pt-PT&sa=X&ved=2ahUKEwi4_PfSnaHvAhUPExQKH7a7aCgoQ6AEwAHoECAIQAg#v=onepage&q=Sensory%20Shelf%20Life%20Estimation%20of%20Food%20Products&f=false

Hough, G., Langohr, K., Gómez, G., & Curia, A. (2003). *Survival analysis applied to sensory shelf life of foods. Journal of Food Science, 68 (1), 359 - 362*. Consultado a: 22/04/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14165.x>

Infoescola (2020). *Papilas Gustativas*. Consultado a: 29/09/2020. Disponível online em: <https://www.infoescola.com/paladar/papilas-gustativas/>

Inspiring Ingredients. (2020). *Goma de Alfarroba*. Consultado a: 19/10/2020. Disponível online em: <https://inspiringingredients.com/produto/goma-de-alfarroba-home-chef/>

ISO 21527-1:2008 (2008). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95*. International Organisation of Standardization. Consultado a: 27/04/2020. Disponível online em: <https://www.iso.org/standard/38275.html>

ISO 4833-1:2013 (2013). *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique*. International Organisation of Standardization. Consultado a: 26/06/2020. Disponível online em: <https://www.iso.org/standard/53728.html>

ISO 21528-2:2017 (2017). *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Detection of Enterobacteriaceae*. International Organisation of Standardization. Consultado a: 09/05/2020. Disponível online em: <https://www.iso.org/standard/63504.html>

ISO 22000:2005 (2005). *Food safety management systems – Requirements for any organization in the food chain*. International Organisation of Standardization. Consultado a: 23/04/2020. Disponível online em: <https://www.iso.org/standard/35466.html>

ISO 17410:2019 (2019). *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms*. International Organisation of Standardization. Consultado a: 06/07/2020. Disponível online em: <https://www.iso.org/standard/67437.html>

ISO 5492:1992 (1992). *Sensory analysis – Vocabulary*. International Organisation of Standardization. Consultado a: 30/04/2020. Disponível online em: <https://www.iso.org/standard/11533.html>

James, S. J. & Evans, J. A. (2006). *Predicting the reduction in microbes on the surface of foods during surface pasteurisation – the “BUGDEATH” project*. *Journal of Food Engineering*, 76 (1), 1 – 6. Consultado a: 08/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.011>

Jay, J. M., Loessner, M. J. & Golden, D. A. (2008). *Modern Food Microbiology*. 7ª Edição, Springer Science + Business Media, Inc., Nova Iorque, EUA, 782 pp. (ISBN 0-387-23180-3). Consultado a: 07/03/2020. Disponível online em: https://books.google.pt/books?id=KbTDBAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Modern+Food+Microbiology&hl=pt-PT&sa=X&ved=2ahUKEwjwIO_OoKHvAhVIA2MBHTePDCgQ6AEwAHoECAMQAg#v=onepage&q=Modern%20Food%20Microbiology&f=false

Júnior. F. P. D. A., Alves, T. W. B., Formiga, T. C. S. & Menezes, M. E. D. S. (2016). *Utilização e associação de alguns edulcorantes artificiais e sua influência na aceitabilidade de alimentos – Uma Revisão*. *Educação Ciência e Saúde*, 3 (2), 65 – 85. (ISSN 2358 – 7504). Consultado a: 28/05/2020. Disponível online em: <http://periodicos.ces.ufcg.edu.br/periodicos/index.php/99cienciaeducacaosaude25/article/view/84>

Kamal, T. Song, Y., Tan, Z., Zhu, B.-W. & Tan, M. (2018). *Effect of hydrocolloid and processing potentiality on water migration in apple jellies of Yinduqing cultivar*. *LWT*. Consultado a: 18/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.064>

Katz, D. L., Doughty, K. & Ali, A. (2011). *Cocoa and Chocolate in Human Health and Disease*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15 (10), 2779 – 2811. Consultado a: 28/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3697>

Kilcast, D., & Subramaniam, P. (2000). *The stability and shelf-life of food*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, EUA, 339 pp. Consultado a: 20/04/2020. Disponível online em: https://books.google.pt/books?id=3_aiAgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=The+stability+and+shelf-life+of+food&hl=pt-PT&sa=X&ved=2ahUKEwi--P2zoaHvAhWDA2MBHV6HDLQ6AEwAHoECAIQAg#v=onepage&q=The%20stability%20and%20shelf-life%20of%20food&f=false

KITLABOR (2020). *Agar Padrao – Plate Count Agar (PCA) 7157A – Acumedia*. Consultado a: 01/04/2020. Disponível online em: <https://kitlabor.com.br/produto/agar-padrao-plate-count-agar-pca/>

Konica Minolta. (a) 2020). *Colorímetro CR-410*. Consultado a: 10/04/2020. Disponível online: <https://sensing.konicaminolta.us/br/products/colorimetro-cr-410/>

Konica Minolta. (b) 2020). *Compreendendo o Espaço de Cor CIE L*C*h*. Consultado a: 10/04/2020. Disponível online em: <https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/compreendendo-o-espaco-de-cor-cie-lch/>

Lakshmi, C. G. (2014). *Food Coloring: The Natural Way*. *Research Journal of Chemical Sciences*, 4 (2), 87 – 96. Consultado a: 31/05/2020. Disponível online em: https://scholar.google.com.br/scholar?q=Food+Coloring%3A+The+Natural+Way&hl=pt-PT&as_sdt=0%2C5&as_ylo=2014&as_yhi=2014

Langendorff, V., Cuvelier, G., Launay, B. & Parker, A. (1997). *Gelation and flocculation of casein micelle/carrageenan mixtures*. *Food Hydrocolloids*, 11 (1), 35 – 40. Consultado a: 21/10/2020. Disponível online em: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(97\)80008-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(97)80008-2)

Lawless, H. T. & Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. 2ª Edição, Springer Science + Business Media, Inc., Nova Iorque, EUA, 598 pp. (ISBN 978-1-4419-6487-8). Consultado a: 19/06/2020. Disponível online em: https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=yrLfrVgU6CsC&oi=fnd&pg=PR6&dq=Sensory+Evaluation+of+Food:+Principles+and+Practices&ots=huJAKfb44&sig=qT3o2j9T_fclHkjcY11_rlr4dKs#v=onepage&q=Sensory%20Evaluation%20o%20Food%3A%20Principles%20and%20Practices&f=false

Lazic, I. B., Raseta, M., Nikolic, D., Lukic, M., Karan, D. & Lilic, S. (2015). *Reducing the Sodium Chloride Content in Chicken Pate by Using Potassium and Ammonium Chloride*. *Procedia Food Science*, 5, 22 – 25. Consultado a: 26/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.006>

Leal, K. N. D. S. (2019). *Avaliação da estabilidade de produtos lácteos através de análise físico-química, espectroscópica e imagens digitais*. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas). Consultado a: 20/08/2020. Disponível online em: https://scholar.google.com/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0,5&cluster=14181778897097069246

Leggieri, M. C., Decontardi, S., Bertuzzi, T., Pietri, A. & Battilani, P. (2017). *Modeling Growth and Toxin Production of Toxigenic Fungi Signaled in Cheese under Different Temperature and Water Activity Regimes*. *Toxins* 9 (1), 4. Consultado a: 01/05/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.3390/toxins9010004>

Leichtweis, M. G., Backes, E., Pereira, C., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Barros, L. & Ferreira, I. C. F. R. (2018). *Recuperação otimizada de antocianinas de Prunus spinosa L. e Ficus carica L. para aplicação como corante alimentar*. *XXIV Encontro Luso Galego de Química, Química Agro-Mar-Alimentar*. Consultado a: 16/07/2020. Disponível online em: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/18307>

Li, J.-M. & Nie, S.-P. (2016). *The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods*. *Food Hydrocolloids*, 53, 46 – 61. Consultado a: 16/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.035>

Lidon, F., & Silvestre, M. M. (2007). *Aditivos Alimentares. Indústrias Alimentares-Aditivos e Tecnologia*. Escolar Editora, Lisboa, Portugal, 360 pp. Consultado a: 18/09/2020. Disponível online em: <https://www.golder.com/insights/block-caving-a-viable-alternative/%0A???>

Liu, Y.-X., Cao, M.-J. & Liu, G.-M. (2019). *Texture analyzers for food quality evaluation*. *Evaluation Technologies for Food Quality*, 441 – 463. Consultado a: 18/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00017-2>

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. Consultado a: 13/07/2020. Disponível online em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/1375>

Luccas, V., Bonomi, É. C. & Kieckbusch, T. G. (2014). *Caracterização comparativa entre chocolates ao leite formulados com gordura de leite anidra e com estearina de gordura de leite*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 17 (2), 130 – 138. Consultado a: 28/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1590/bjft.2014.020>

Luzzi, J. C. (2010). *Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de folhas de louro – Laurus nobilis L. – Frente às bactérias Escherichia coli e Salmonella enteritidis. (Monografia de Bacharelato em Química Industrial, Univates)*. Consultado a: 15/03/2020. Disponível online em: <https://www.univates.br/bdu/handle/10737/464>

Madrid V. A., Cenzano, J. & Vicente, J. (1994). *Nuevo Manual de Industrias Alimentarias. Ampliada ed. Madrid : Iragra, S.A. (ISBN 9788578110796)*. Consultado a: 14/05/2020. Disponível online em: https://books.google.pt/books/about/Nuevo_manual_de_industrias_alimentarias.html?id=IGJyGQAACAAJ&redir_esc=y

Marangoni, F., Pellegrino, L., Verduci, E., Ghiselli, A., Bernabei, R., Calvani, R., Cetin, I., Giampietro, M., Perticone, F., Piretta, L., Giacco, R., Vecchia, C. L., Brandi, M. L., Ballardini, D., Banderali, G., Bellentani, S., Canzone, G., Cricelli, C., Faggiano, P., Ferrara, N., Flachi, E., Gonnelli, S., Macca, C., Magni, P., Marelli, G., Marrocco, W., Miniello, V. L., Origo, C., Pietrantonio, F., Silvestri, P., Stella, R., Strazzullo, P., Troiano, E. & Poli, A. (2018). *Cow's Milk Consumption and Health: A Health Professional's Guide*. *Journal of the American College of Nutrition*, 1 – 12. Consultado a: 14/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1491016>

Matos, L. R. (2014). *Microbiologia Preditiva Aplicada à análise de amostras de carne de vaca e porco. (Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa)*. Consultado a: 13/09/2020. Disponível online em: <https://run.unl.pt/handle/10362/14283>

MBL. (2014). *Aerobic Plate Count*. Consultado a: 16/05/2020. Disponível online em: <http://mb-labs.com/resources/aerobic-plate-count/>

Milani, J. & Maleki, G. (2012). *Hydrocolloids in Food Industry. Food Industrial Processes - Methods and Equipment*. Consultado a: 28/09/2020. Disponível online em: https://www.researchgate.net/publication/221925367_Hydrocolloids_in_Food_Industry

Mizrahi, S. (2011). *Accelerated shelf life testing of foods. Food and Beverage Stability and Shelf Life*, 482 – 506. Consultado a: 06/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1533/9780857092540.2.482>

Mohammadi, A., Rafiee, S., Emam-Djomeh, Z. & Keyhani, A. (2008). *Kinetic Models for Colour Changes in Kiwifruit Slices During Hot Air Drying*. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4 (3), 376 – 383. Consultado a: 10/04/2020. Disponível online em: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/31068524/15.pdf?1364799226=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DKinetic_Models_for_Colour_Changes_in_Kiw.pdf&Expires=1615230941&Signature=C~NQWuz1pERoti0jcOdPrInUukhr34KkygZAJvOFRXAFKZUOyeTLSyOQIKrsZnGWdMaoJk2Khbk11t1qnQikBtTPoUjCNQpE~v6sS2v4ZWVZ96bD1TGAWFZsm97hvZhLEPB9YEIELqm~JyVwDEEclzMd9H6fsj2Tg0nKnZJIB7z1srmoTbo0ufSI0-D0ZFQLrXQhG4cJ77qNgQve8GErQrMcQEFZiFE3bFjPBed4Tv~qkAtkKOacxcTg1aDP2Oz0DBYB7ptl9HWVpvlxzNJ9Zt5Hla~2Afx8NM20~OkY5BrDymjcQG2l1Nas23r4HJbckVI-m41RgUsk1~yD~GIEA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Monteiro, S. E. A. (2016). *Avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo comercializadas na região de Lisboa. (Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa)*. Consultado a: 18/06/2020. Disponível online em: <https://run.unl.pt/handle/10362/20333>

Moorhouse, R., Walkinshaw, M. D. & Arnott, S. (1977). *Xanthan Gum – Molecular Conformation and Interactions. Extracellular Microbial Polysaccharides, 90 – 102*. Consultado a: 31/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1021/bk-1977-0045.ch007>

Moschopoulou, E., Moatsou, G., Syrokou, M. K., Paramithiotis, S. & Drosinos, E. H. (2019). *Food quality changes during shelf life. Food Quality and Shelf Life, 1 - 31*. Consultado a: 22/04/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817190-5.00001-x>

Moutinho, A. M. R., Rosa, C. M. F. G., Vieira, E. R. S., Medeiros, F. M. T. V., Machado, L. M. Á. S., Leal, M. R. S. & Rosa, U. F. L. (2011). *Inspeções ambientais à indústria do leite e derivados – Relatório temático. Angra do Heroísmo, Açores*. Consultado a: 19/03/2020. Disponível online em: https://servicos-sraa.azores.gov.pt/grastore/ira/Relat%C3%B3rioTem%C3%A1ticoLatic%C3%ADnios_IRA.pdf

Necas, J. & Bartosikova, L. (2013). *Carrageenan: a review. Veterinarni Medicina, 58 (4), 187 – 205*. Consultado a: 07/09/2020. Disponível online em: <http://vri.cz/docs/vetmed/58-4-187.pdf>

Neto, C. J. F., Figueirêdo, R. M. F. & Queiroz, A. J. M. (2005). *Avaliação sensorial e da atividade de água em farinhas de mandioca temperadas. Ciências Agrotécnicas, 29 (4)*. Consultado a: 02/02/2020. Disponível online em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542005000400011&script=sci_arttext

Nielsen. (1º quadrimestre 2018). Consultado a: 21/12/2019. Disponível online em: <https://www.nielsen.com/pt/pt.html>

Nikaedo, P. H. L., Amaral, F. F. & Penna, A. L. B. (2004). *Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragena e guar. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 40 (3), 397 – 404*. Consultado a: 06/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000300016>

NZFSA. (2005). *A guide to calculation shelf-life of foods: information booklet for the food industry. New Zealand Food Safety Authority*. Consultado a: 22/04/2020. Disponível online em: <https://www.nzfsa.govt.nz>

Oliveira, W. S., Neves, D. A. & Ballus, C. A. (2019). *Mature chemical analysis methods for food chemical properties evaluation. Evaluation Technologies for Food Quality, 63 – 90*. Consultado a: 18/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00005-6>

Opara, U. L., Caleb, O. J., & Belay, Z. A. (2019). *Modified atmosphere packaging for food preservation. Food Quality and Shelf Life, 235 – 259*. Consultado a: 09/06/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00007-0>

Patras, A. (2018). *Stability and colour evaluation of red cabbage waste hydroethanolic extract in presence of different food additives or ingredients. Food Chemistry*. Consultado a: 24/10/2020. Disponível online em: <https://sci-hub.st/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461831671>

Pereira, A. R. D. S. (2019). *Carmina em logurtes: Ocorrência e Avaliação do Risco. (Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra)*. Consultado a: 19/09/2020. Disponível online em: <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/88247>

Pereira, B. D. A. (2016). *Medidor de pH com calibração de pH e compensação automática de temperatura. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Eletrotécnica e de Computadores, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa)*. Consultado a: 01/03/2020. Disponível online em: <https://run.unl.pt/handle/10362/31900>

Pereira, V. P. A. (2014). *Avaliação do Prazo de Validade de Conservas de Peixe Após Abertura. (Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade – Especialização em Água e Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto)*. Consultado a: 27/04/2020. Disponível online em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/76970/2/33066.pdf>

Prajapati, V. D., Maheriya, P. M., Jani, G. K. & Solanki, H. K. (2014). *REFRACTED: Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. Carbohydrate Polymers, 105, 97 – 112*. Consultado a: 22/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.067>

Priyadarshani, I. & Rath, B. (2012). *Commercial and industrial applications of micro algae – A review. Journal of Algal Biomass Utilization, 3 (4), 89 – 100*. Consultado a: 10/04/2020. Disponível online em: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/44276968/paper14vol3no4.pdf?1459469490=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DCommercial_and_industrial_applications_o.pdf&Expires=1615319180&Signature=LdjVRrVSybUBo3fpnK~aEc163c82yD199wQrvJZCXmeZhYI6hDnuJ6sqgbSx3BJeh8vNdp7cK2u4MhjjgMjPbWv8kvEzPCdneDRkGDOo~xPL5udV2EeM9tBx3Tm6kgbMYxM8BYC0pO9Jh03eC1XUpZcq17GUI0RbkbRp~Mmt25nfqT7oF7LcaD~Ggq6cUG1HfsvW2Cg4S~08KfnEOJBxvf~3WknQVsA1ZAZ3i~XGzfrgHxGYfTHWsd1c~G~vaVJtjivr5CuS2ppBL1tNlrLO~183JQ6Cnmz0IOne0S7pujAjBRKj4TmBEWIIIVpU6UVUT7NsDPOSIPvBXzNrEWA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Rebello, I. Á. G. A. (2017). *A utilização de frutos secos portugueses na produção de gelados artesanais. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa)*. Consultado a: 15/06/2020. Disponível online em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/14829>

Regulamento (UE) n.º 231/2012 da Comissão de 9 de Março de 2012. Consultado a: 23/09/2020. Disponível online em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/pt/TXT/?uri=CELEX%3A32012R0231>

Regulamento (UE) n.º 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011. Consultado a: 16/02/2020. Disponível online em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1129&from=IT>

Regulamento (CE) n.º 1334/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008. Consultado a: 12/03/2020. Disponível online em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1334&from=EN>

Richter, M. & Lannes, S. C. D. S. (2007). *Ingredientes usados na indústria de chocolates. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 43 (3)*. Consultado a: 14/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000300005>

Roos, Y. H. (2001). *Water activity and plasticization*. Eskin, N. A. M. & Robinson, D. S. (Eds.), *Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical and Microbiological Changes*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 3 - 36. (ISBN 978-1-4200-3665-7). Consultado a: 17/03/2020. Disponível online em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=pDHPBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Food+Shelf+Life+Stability:+Chemical,+Biochemical+and+Microbiological+Changes.&ots=1U2bZFESTk&sig=zTc8JtEtEKTmnmK7WFXthTkxjJc#v=onepage&q=Food%20Shelf%20Life%20Stability%3A%20Chemical%2C%20Biochemical%20and%20Microbiological%20Changes.&f=false>

- Rosenthal, A. J. (1999). *Relation between instrumental and sensory measures of food texture*. Food Texture: Measurement and Perception, Aspen Publications. Consultado a: 11/03/2020. Disponível online em: https://www.researchgate.net/profile/Andrew-Rosenthal-2/publication/277767132_Relation_Between_Instrumental_and_Sensory_Measures_of_Food_Texture/links/571f715a08aead26e71b636d/Relation-Between-Instrumental-and-Sensory-Measures-of-Food-Texture.pdf
- Sadat, A., Ezzatpanah, H. & Bakhoda, H. (2017). *Rheological properties of instant milk-based puddings prepared with emulsifying salt-containing milk powders*. International Journal of Dairy Technology, 71 (3), 791 – 800. Consultado a: 10/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12487>
- Sanches, F. L. (2018). *Utilização de leite de coco na elaboração de sobremesa cremosa sabor cacau*. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul). Consultado a: 10/04/2020. Disponível online em: <https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/2722>
- Sánchez, C. (2018). *Farinha de Aveia: Propriedades, tipos e como utilizar*. Consultado a: 01/11/2020. Disponível online em: <https://www.hsnstore.pt/blog/nutricao/hidratos-de-carbono/farina-de-aveia/>
- Santos, J. S., & Oliveira, M. B. P. P. (2012). *Revisão: alimentos frescos minimamente processados embalados em atmosfera modificada*. Brazilian Journal of Food Technology, 15 (1), 1 - 14. Consultado a: 09/06/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012000100001>
- Saunders, A. B. (2016). *Dairy desserts. Reference Module in Food Science*. Palmerston North, New Zealand : Elsevier Inc, 1-8p. ISBN 9780081005965v. Consultado a: 18/03/2020. Disponível online em: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/desserts>
- Saraiva, M., Correia, C. B., Cunha, I. C., Maia, C., Bonito, C. C., Furtado, R. & Calhau, M. A. (2019). *Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: valores-guia*. Lisboa: INSA IP, Portugal. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge: 42 pp. Consultado a: 21/02/2020. Disponível online em: <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5610>
- Shinohara, N. K. S., Macedo, I. M. E., Sousa, T. L. T. L., Pimentel, R. M. D. M., Padilha, M. D. R. D. F., Xavier, V. L. & Botelho, I. (2019). *Parâmetros de qualidade da nata de produção artesanal*. Journal of Environmental Analysis and Progress, 4 (1), 71 – 77. Consultado a: 15/04/2020. Disponível online em: <http://www.journals.ufrpe.br/index.php/JEAP/article/view/2192>
- Sigma-Aldrich. (2020). *70189 Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG Agar; VRBD Agar; Violet Red Bile Dextrose Agar)*. Consultado a: 03/04/2020. Disponível online em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/70189dat.pdf>
- Silva, J. T. D. P., Leimann, F. V. & Gonçalves, O. H. (2015). *Obtenção de micropartículas estruturadas contendo curcumina*. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Unicamp – Campinas – São Paulo, 19 a 22 de julho de 2015. Consultado a: 12/09/2020. Disponível online em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeqic2015/235-32944-265093.pdf>
- Simensato, L. A. & Bueno, S. M. (2019). *Importância da qualidade da água na indústria de alimentos*. Curso de Engenharia de Alimentos – UNILAGO, Volume 1, n.º 1. Consultado a: 25/04/2020. Disponível online em: <http://revistas.unilago.edu.br/index.php/revista-cientifica/article/view/204>
- Singh, T. K. & Cadwallader, K. R. (2004). *Ways of measuring shelf-life and spoilage*. 1ª Edição, CRC Press, Woodhead Publishing Limited (Cambridge England), Boca Raton, EUA, 381 pp. (ISBN 1-85573-732-9). Consultado a: 31/03/2020. Disponível online em: https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=bdnfe_Q5UAMC&oi=fnd&pg=PA165&dq=Ways+of+measuring+shelf-life+and+spoilage&ots=RwDN6LD8uO&sig=IG_mZBjbWn92RvZBCQ-RQivBYpg#v=onepage&q=Ways%20of%20measuring%20shelf-life%20and%20spoilage&f=false

Singh-Ackbarali, D. & Maharaj, R. (2014). *Sensory Evaluation as a Tool in Determining Acceptability of Innovative Products Developed by Undergraduate Students in Food Science and Technology at the University of Trinidad and Tobago*. *Journal of Curriculum and Teaching*, Volume 3, 10– 27. Consultado a: 23/09/2020. Disponível online em: <https://eric.ed.gov/?id=EJ1157866>

Singham, P., Birwal, P. & Yadav, B. K. (2015). *Importance of Objective and Subjective Measurement of Food Quality and their Inter-relationship*. *Journal of Food Processing & Technology*, 6 (9), 1 – 3. Consultado a: 10/03/2020. Disponível online em: https://www.researchgate.net/profile/Pragati-Singham/publication/282352817_Importance_of_Objective_and_Subjective_Measurement_of_Food_Quality_and_their_Inter-relationship/links/56cbcd2108ae96cdd06fd9b7/Importance-of-Objective-and-Subjective-Measurement-of-Food-Quality-and-their-Inter-relationship.pdf

Siracusa, V. & Lotti, N. (2019). *Intelligent packaging to improve shelf life*. *Food Quality and Shelf Life*, 261 – 279. Consultado a: 20/06/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00008-2>

Stone, H. (2018). *Example food: What are its sensory properties and why is that important?* *npj Science of Food*, 2 (11), 1 – 3. Consultado a: 12/04/2020. Disponível online em: <https://www.nature.com/articles/s41538-018-0019-3>

Tavares, S. C. P. (2013). *Determinação da Vida Útil de Alimentos prontos para consumo em estabelecimento “TAKE-AWAY” – Revisão de Procedimentos Assentes na Qualidade e Segurança*. (Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa). Consultado a: 05/03/2020. Disponível online em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/5888>

Techer, C., Jan, S., Thierry, A., Maillard, M.-B., Grosset, N., Galet, O., Breton, V., Gautier, M. & Baron, F. (2020). *Identification of the bacteria and their metabolic activities associated with the microbial spoilage of custard cream desserts*. *Food Microbiology*, 86, 103317. Consultado a: 27/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103317>

Terefe, N. S., Buckow, R. & Versteeg, C. (2013). *Quality-Related Enzymes in Fruit and Vegetable Products: Effects of Novel Food Processing Technologies, Part 1: High-Pressure Processing*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54 (1), 24 – 63. Consultado a: 27/05/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.566946>

Torbica, A., Belović, M., Mastilović, J., Kevrešan, Ž., Pestorić, M., Škrobot, D. & Hadnadev, 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. Consultado a: 11/03/2020. Disponível online em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096030851600033X>

Vaclavik, V. A. & Christian, E. W. (2008). *Evaluation of Food Quality*. 3ª Edição, *Essentials of Food Science, Food Science Texts Series*. Springer, Nova Iorque, EUA, 571 pp. (ISBN 978-0-387-69939-4). Consultado a: 14/05/2020. Disponível online em: <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-1-4614-9138-5>

Vázquez, C. V., Rojas, M. G. V., Ramírez, C. A., Chávez-Servín, J. L., García-Gasca, T., Martínez, R. A. F., García, O. P., Rosado, J. L., López-Sabater, C. M., Castellote, A. I., Montemayor, H. M. A. & Wakai, S., Arazoe, T., Ogino, C. & Kondo, A. (2017). *Future insights in fungal metabolic engineering*. *Bioresource Technology*, 245, 1314 – 1326. Consultado a: 06/05/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.095>

Wakai, S., Arazoe, T., Ogino, C. & Kondo, A. (2017). *Future insights in fungal metabolic engineering*. *Bioresource Technology*, 245, 1314 – 1326. Consultado a: 01/04/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.095>

Wojdyło, A., Figiel, A. & Oszmiański, J. (2009). *Effect of Drying Methods with the Application of Vacuum Microwaves on the Bioactive Compounds, Color, and Antioxidant Activity of Strawberry Fruits*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (4), 1337 – 1343. Consultado a: 20/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1021/jf802507j>

Yang, J. & Lee, J. (2019). *Application of Sensory Descriptive Analysis and Consumer Studies to Investigate Traditional and Authentic Foods: A Review*. *Foods*, 8 (2), 54. Consultado a: 11/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.3390/foods8020054>

Young, N. W. G. & O'Sullivan, G. R. (2011). *The influence of ingredients on product stability and shelf life*. *Food and Beverage Stability and Shelf Life*, 132 – 183. Consultado a: 21/09/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1533/9780857092540.1.132>

Ziyaina, M. Rasco, B., Coffey, T., Ünlü, G. & Sablani, S. S. (2019). *Colorimetric detection of volatile organic compounds for shelf-life monitoring of milk*. *Food Control*. Consultado a: 09/10/2020. Disponível online em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.018>

ANEXO I:

• Reagentes

Tabela AI.1: Quadro com os reagentes utilizados durante a atividade prática e a sua respetiva referência e marca.

Reagentes Químicos	Referência	Marca
Água Destilada	-----	Merck Millipore, MA, EUA
Água Milli-Q	-----	Merck Millipore, MA, EUA
Diluyente Triptona-Sal	BK014HA	Biokar Diagnostics, França
Meio DRBC	BK198HA	Biokar Diagnostics, França
Meio Glucose OF agar	Cat.2150	Condalab, Madrid
Meio PCA	BK144HA	Biokar Diagnostics, França
Meio Triptona Soja Agar	BK047	Biokar Diagnostics, França
Meio VRBG	BK011HA	Biokar Diagnostics, França


Nota: Todos os reagentes acima mencionados foram utilizados sem qualquer modificação sobre ele.

• Material de Laboratório

Tabela AI.2: Quadro com o material utilizado durante a atividade prática e o seu respetivo modelo e marca.

Equipamento	Modelo	Marca
Autoclave	K-400	Darlab
Balança	TR-203	Denver Instrument Company, NY, EUA
Balança	-----	AE Adam, CT, EUA
Colorímetro	Croma Meter CR-410	Konica Minolta, Tokyo, Japão
Câmara de Fluxo Laminar Vertical	-----	STERIL-HELIOS, Itália
Eléctrodo de pH	HI-2210-02 Bench Top pH Meter	HANNA Instruments, Portugal
Estufa a 30 ± 2°C	-----	Memmert, Alemanha
Estufa a 37 ± 2°C	-----	Memmert, Alemanha
Estufa a 25 ± 2°C	-----	Memmert, Alemanha
Placa Eléctrica	M2-A	Argo Lab, Itália
<i>Stomacher</i>	Star Blender LB 400	VWR, PA, EUA
Vortex	K550	GE GONIF

ANEXO II: Questionário de Avaliação Sensorial.

	Questionário Avaliação Sensorial	Página: 01 de 01

Nome: _____

Data: _____

Idade: _____

Sexo:

M
F

Pudim Zero Flan

Procedimento: Receberá duas amostras identificadas com Início e Fim. De acordo com a escala fornecida abaixo, classifique cada amostra com o número que melhor se adequa à sua opinião.

Parâmetros Gerais:

- 1 → Não Gostei Nada
- 2 → Gostei Pouco
- 3 → Gostei
- 4 → Gostei Muito
- 5 → Excelente

Doçura:

- 1 → Sem Doce
- 2 → Pouco Doce
- 3 → Gosto mesmo
- 4 → Muito Doce
- 5 → Exageradamente Doce

Amostras	Aspecto	Cor	Textura	Sabor	Doçura	Classificação Geral
Pudim Zero Flan (Início)						
Pudim Zero Flan (Fim)						

Responda às seguintes questões, assinalando com uma "x" para o Pudim Zero Chocolate.

Compraria este produto?
 Sim → Qual?
 Não
 { Pudim Zero Flan (Início)
 Pudim Zero Flan (Fim)

Recomendaria este produto?
 Sim → Qual?
 Não
 { Pudim Zero Flan (Início)
 Pudim Zero Flan (Fim)

Agradecemos a sua Participação!

Elaborado por: _____

Mod.090

ANEXO III:

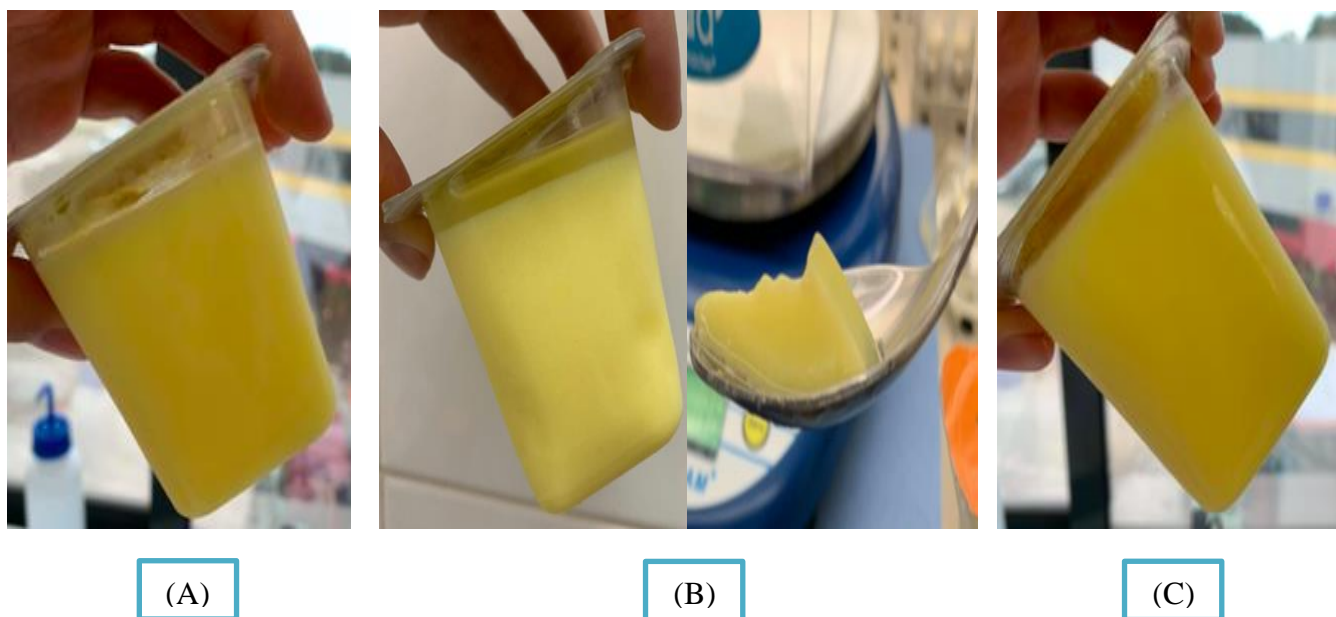


Figura AIII.1: Aparência das amostras INÍCIO (A), MEIO (B) e FIM (C) do Pudim Zero Flan.

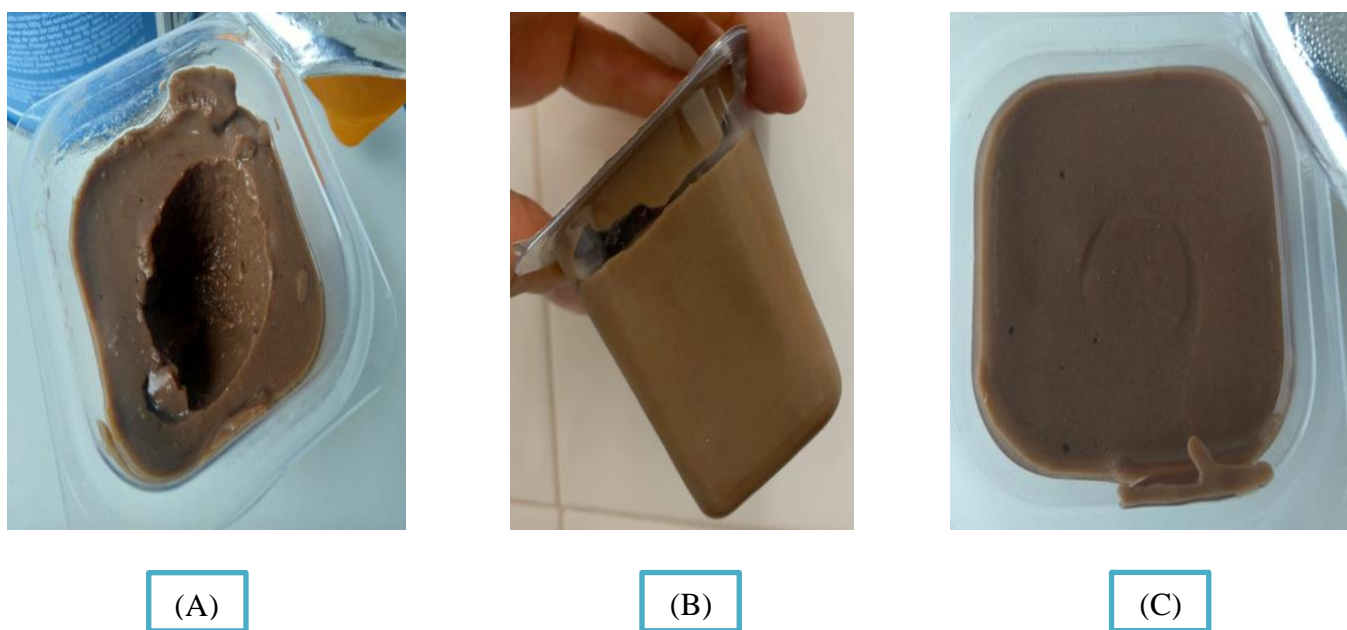


Figura AIII.2: Aparência das amostras INÍCIO (A), MEIO (B) e FIM (C) do Pudim Zero Chocolate.



(A)



(B)



(C)

Figura AIII.3: Aparência das amostras INÍCIO (A), MEIO (B) e FIM (C) do Cremoso Chocolate.



(A)



(B)



(C)

Figura AIII.4: Aparência das amostras INÍCIO (A), MEIO (B) e FIM (C) do Cremoso Nata-Caramelo.