



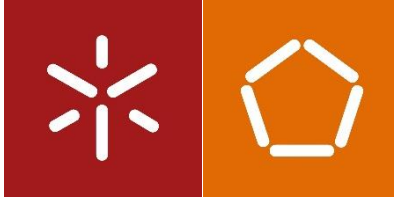
**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Susana Soares Pereira

**Avaliação da termorresistência de *Bacillus cereus* em preparados de cereais a partir da variação da temperatura, pH e atividade da água**







Universidade do Minho  
Escola de Engenharia

Susana Soares Pereira

**Avaliação da termorresistência de *Bacillus cereus* em preparados de cereais a partir da variação da temperatura, pH e atividade da água**

Dissertação de mestrado  
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Trabalho realizado sob orientação da  
**Professora Doutora Lúgia Raquel Marona Rodrigues**

## DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

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

*Licença concedida aos utilizadores deste trabalho*



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações**

**CC BY-NC-ND**

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

## AGRADECIMENTOS

Nesta secção gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, me apoiaram e contribuíram para o meu sucesso nesta fase académica e especialmente nestes últimos 9 meses de estágio.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à professora doutora Lígia Rodrigues por me ter concedido a oportunidade de estagiar num contexto empresarial e numa empresa tão fantástica como a FRULACT. Obrigada por toda a ajuda e simpatia com que me acompanhou durante este processo.

Gostaria também de agradecer à Cristina Rodrigues, minha orientadora na empresa, que tão bem de mim tratou desde o início. Obrigada pela partilha de conhecimentos, paciência, preocupação, carinho e me fazer sempre sentir em casa.

À Patrícia, minha colega de laboratório e companheira de café, obrigada por toda a ajuda e simpatia com que sempre me brindaste.

A todo o corpo técnico da FRULACT, desde o departamento da qualidade até ao da inovação, foram todos impecáveis, sempre prontos a ajudar.

À minha família, irmãos e avó, mas especialmente aos meus pais, pelo apoio incondicional sempre e pela disponibilização do carro e aos meus amigos, especialmente aqueles que o mestrado me trouxe.

Ao Francisco, por estar sempre lá e me apoiar em todos os momentos.

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

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

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

## Avaliação da termorresistência de *Bacillus cereus* em preparados de cereais a partir da variação da temperatura, pH e atividade da água

### RESUMO

A segurança alimentar representa uma das principais preocupações nos dias de hoje, devido à possibilidade de haver propagação de microorganismos patogênicos que poderá pôr em risco a saúde humana. Existe, portanto, a necessidade de se encontrar estratégias e procedimentos que visem a inativação desses microorganismos a fim de se garantir a qualidade alimentar. O processamento térmico é um dos métodos mais utilizados para a preservação de alimentos, pois consegue reduzir a carga microbiana permitindo um aumento do tempo de vida dos alimentos. Este método é, normalmente, aliado com o controlo das condições ótimas de desenvolvimento de microorganismos como o pH, a atividade da água, entre outras. O objetivo desta dissertação foi, portanto, avaliar os efeitos, a partir da aplicação de diferentes binómios tempo/temperatura na termorresistência de esporos da bactéria *Bacillus cereus* em 3 amostras da FRULACT que possuíam diferentes valores de pH, atividade da água e concentração de açúcar. No fim do processamento térmico foram avaliados os parâmetros de morte cinética (valor de D e z). Para a amostra 1 (pH= 6.5;  $A_w$ = 0.98; 22 °Bx) obteve-se  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 65.36 min.;  $z$ = 10.03 °C a um binómio de tempo/temperatura de “ingredientação” de 50 °C/1h e  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 12.20 min.;  $z$ = 3.555 °C a um binómio de tempo/temperatura de “ingredientação” de 60 °C/1h. Para a amostra 2 (pH= 6.5;  $A_w$ = 0.98; 25 °Bx) obteve-se  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 24.21 min.;  $z$ = 9.718 °C a um binómio de tempo/temperatura de “ingredientação” de 50 °C/1h e  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 7.899 min.;  $z$ = 18.32 °C a um binómio de tempo/temperatura de “ingredientação” de 60 °C/1h. Já na amostra 3, que possuía um pH mais ácido (pH=3.6) e por isso menos favorável ao crescimento dos esporos de *B. cereus* obteve-se  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 7.463 min.;  $z$ = 11.25 °C a um binómio de tempo/temperatura de “ingredientação” de 50 °C/1h e  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 10.30 min.;  $z$ = 16.42 °C. Assim sendo, foi possível constatar que, em termos de valores de z, as condições da amostra 1 são mais favoráveis à inativação do *B. cereus* uma vez que se trata da amostra que apresenta os valores de z mais baixos. No entanto, podemos concluir, apesar da uniformidade limitada na representação gráfica, que os valores de D são muito elevados e que a amostra 3 é aquela que, genericamente, apresentou condições mais favoráveis à inativação da bactéria.

**Palavras-chave:** acidez; atividade da água; *Bacillus*; esporulação; pasteurização; termorresistência

## Evaluation of the thermal resistance of *Bacillus cereus* in cereal preparations from variations in temperature, pH and water activity

### ABSTRACT

Food safety represents one of the main concerns these days, due to the possibility of spreading pathogenic microorganisms that could endanger human health. Therefore, there is a need to find strategies and procedures aiming at inactivating those microorganisms to ensure food quality. Thermal processing is one of the most used methods for food preservation, as it manages to reduce the microbial load, allowing an increase in the food lifespan. This method is usually combined with the control of optimal conditions for the development of microorganisms such as pH, water activity, among others. The objective of this dissertation was, therefore, to evaluate the effects, from the application of different time/temperature binomials, in the thermal resistance of spores of the *Bacillus cereus* bacteria in 3 samples of FRULACT with different pH values, water activity and sugar concentration. At the end of the thermal processing, the kinetic death parameters (D and z values) were evaluated. For sample 1 (pH= 6.5;  $A_w$ = 0.98; 22 °Bx) it was obtained  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 65.36 min.;  $z$ = 10.03 °C at an “ingredientation” time/temperature binomial of 50 °C/1h and  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 12.20 min.;  $z$ = 3.555 °C at an “ingredientation” time/temperature binomial of 60 °C/1h. In sample 2 (pH= 6.5;  $A_w$ = 0.98; 25 °Bx) it was obtained  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 24.21 min.;  $z$ = 9.718 °C at an “ingredientation” time/temperature binomial of 50 °C/1h and  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 7.899 min.;  $z$ = 18.32 °C at an “ingredientation” time/temperature binomial of 60 °C/1h. In sample 3, which had a more acidic pH (pH=3.6) and therefore less favorable to the growth of *B. cereus* spores,  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 7.463 min.;  $z$ = 11.25 °C at an “ingredientation” time/temperature binomial of 50 °C/1h and  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 10.30 min.;  $z$ = 16.42 °C. Therefore, it was found that, when it comes to z values, the conditions of sample 1 are more favourable for the inactivation of *B. cereus*, since this is the sample with the lowest z values. However, we can conclude, despite the limited uniformity of the graphical representation, that the D values are very high and that sample 3 is the one that, generically, presents the most favourable conditions to obtain bacterial inactivation.

**Keywords:** acidity; *Bacillus*; pasteurization; sporulation; thermoresistance; water activity



## ÍNDICE GERAL

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DO TRABALHO POR TERCEIROS.....	ii
AGRADECIMENTOS .....	iii
DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE .....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	x
<b>CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Motivação e enquadramento do projeto .....	1
1.2 Apresentação da empresa .....	1
1.3 Objetivos.....	2
1.4 Organização da dissertação.....	3
<b>CAPÍTULO 2- FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>4</b>
2.1 Higiene e segurança alimentar .....	4
2.2 Microbiologia alimentar .....	5
2.3 Bactérias.....	6
2.3.1 Reprodução bacteriana .....	7
2.3.1.1 Divisão binária .....	7
2.3.1.2 Esporulação.....	8
2.3.2 Bacillus cereus.....	9
2.4 Fatores que afetam o crescimento bacteriano .....	10
2.4.1 Fatores intrínsecos.....	10
2.4.1.1 Atividade da água ( $A_w$ ) .....	10
2.4.1.2 Acidez.....	12

2.4.1.3	Potencial de oxidação/redução.....	15
2.4.1.4	Composição química do alimento- conteúdo em nutrientes.....	16
2.4.1.5	Estrutura biológica do alimento .....	17
2.4.1.6	Compostos antimicrobianos .....	17
2.4.2	Fatores extrínsecos .....	18
2.4.2.1	Temperatura.....	18
2.4.2.2	Humidade relativa.....	19
2.4.2.3	Composição do meio- presença e concentração de gases .....	19
2.5	Processamento térmico: Fatores que afetam a termorresistência de <i>Bacillus cereus</i> .....	20
2.5.1	Atividade da água.....	21
2.5.2	pH.....	21
2.5.3	Composição da matriz .....	21
2.5.4	Curva de crescimento .....	22
2.6	Parâmetros de morte térmica- valor de D e Z.....	24
2.6.1	Parâmetros de morte térmica de <i>Bacillus cereus</i> .....	25
2.7	Histórico de ensaios desenvolvidos na FRULACT.....	26
<b>CAPÍTULO 3- MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>		<b>27</b>
3.1	Preparação do material .....	27
3.2	Procedimento experimental .....	28
3.2.1	Elaboração dos preparados.....	28
3.2.2	Preparação do inóculo .....	28
3.2.3	“Ingredientação” .....	29
3.2.4	Pasteurização .....	30
3.3	Análises microbiológicas.....	31
3.3.1	Quantificação de esporos bacterianos.....	31
3.3.2	Análise de resultados .....	31

<b>CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
4.1 Avaliação do impacto dos diferentes binómios tempo/temperatura de “ingredientação” e pasteurização na carga microbiana dos preparados .....	32
4.1.1 Efeito da temperatura na termorresistência bacteriana .....	32
4.1.2 Determinação dos parâmetros de morte térmica .....	34
4.2 Avaliação do impacto dos fatores intrínsecos na termorresistência bacteriana .....	37
4.2.1 Efeito do pH.....	37
4.2.2 Efeito da atividade da água .....	39
4.3 Avaliação do impacto de todos os fatores inerentes ao crescimento microbiano.....	40
<b>CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>48</b>
ANEXO A .....	48
Carga microbiana associada aos binómios de “ingredientação” .....	48
ANEXO B.....	52
Valores do Teste <i>Anova</i> fator único.....	52
ANEXO C.....	53
Determinação dos parâmetros cinéticos de inativação térmica .....	53
Valor de D .....	54
Valor de z.....	55

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus <i>Celsius</i> (escala de medida da temperatura)
°Brix	Grau Brix (escala de medida da quantidade de açúcar e outros solutos)
$A_w$	Atividade da água
BPW	<i>Buffer Peptone Water</i>
CAC	Comissão Codex Alimentarius
$D_T$	Tempo necessário para ocorrer a redução de um ciclo logarítmico (minutos)
Eh	Potencial de oxidação/redução
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
$p$	Pressão de vapor de água da solução
$p_0$	Pressão de vapor de água do solvente
$p_v$	Pressão do vapor de água no produto alimentar
$p_{vs}$	Pressão de vapor de água saturado, à mesma temperatura do produto alimentar
$z$	Aumento de temperatura necessário para reduzir um ciclo logarítmico (°C)
UFC	Unidades formadoras de colónias

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reprodução bacteriana por divisão binária (retirado de: Goel, 2017).....	7
<b>Figura 2.</b> Ciclo do processo de esporulação de <i>B. cereus</i> (retirado de: Warren & Gould, 2006)..	8
<b>Figura 3.</b> Taxonomia da bactéria <i>B. cereus</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Fases da curva de crescimento bacteriano (retirado de: Goel, 2017).....	22
<b>Figura 5.</b> Demonstração gráfica da obtenção dos valores D e z (retirado de: Deak, 2014). .....	24
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo da obtenção da amostra com “ingredientação” 50 °C/1h e 60 °C/1h e sua respetiva análise.....	29
<b>Figura 7.</b> Esquema representativo do processamento térmico das diferentes amostras em estudo. ....	30
<b>Figura 8.</b> Exemplo de placas de quatro diluições diferentes, em duplicado. Imagem real captada durante a contagem de placas.....	32
<b>Figura 9.</b> Carga bacteriana obtida (valores do logaritmo das UFC's) em cada um dos binómios tempo/temperatura em função da temperatura de pasteurização aplicada.....	33
<b>Figura 10.</b> Valores de z determinados para a amostra 1 sujeito a diferentes binómios tempo/temperatura de “ingredientação” e pasteurização. A – 50 °C/1h; B – 60 °C/1h.....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação de bactérias de acordo com as suas relações com o oxigénio (retirado de: Goel, 2017). .....	6
<b>Tabela 2.</b> Atividade da água representativa de alguns alimentos (retirada de: Ross & Nichols, 2014) .....	11
<b>Tabela 3.</b> Valores de $a_w$ propícios ao crescimento de diversas espécies bacterianas (retirado de: Baptista & Venâncio, 2003). .....	12
<b>Tabela 4.</b> Valores de pH de alguns alimentos comuns (retirado de: Coton & Leguerinel, 2014). .....	13
<b>Tabela 5.</b> Exemplo das gamas de pH em que ocorre crescimento de algumas espécies bacterianas (retirado de: Coton & Leguerinel, 2014). .....	13
<b>Tabela 6.</b> Interação do pH e da $a_w$ para o controlo de esporos, em alimentos sujeitos a um tratamento térmico, para destruir células vegetativas, e que foram subsequentemente embalados. ....	14
<b>Tabela 7.</b> Interação do pH e da $a_w$ para o controlo de esporos, em alimentos não sujeitos a um tratamento térmico ou sujeitos a um tratamento térmico, mas não embalados. ....	14
<b>Tabela 8.</b> Classificação de microorganismos de acordo com a gama de crescimento do Eh (retirado de: Pinto & Pereira, 2016). .....	15
<b>Tabela 9.</b> Potenciais oxidação/redução (Eh) de alguns alimentos (retirado de: Prévost & Brillet-Viel, 2014). .....	16
<b>Tabela 10.</b> Classificação de bactérias quanto à gama de temperaturas em que ocorre crescimento (retirado de: Jay, 2005). .....	18
<b>Tabela 11.</b> Gama de temperaturas a que crescem diversas espécies bacterianas (retirado de: Jay, 2005). .....	18
<b>Tabela 12.</b> Resultados da inativação térmica de esporos de <i>B. cereus</i> em amostras com diferentes valores de $a_w$ , pH e concentração de açúcares obtidos em diferentes estudos. ....	20
<b>Tabela 13.</b> Exemplo de estudos em que foi avaliada a inativação térmica de <i>B. cereus</i> em diversos alimentos. ....	25
<b>Tabela 14.</b> Resultados obtidos em estudos anteriormente realizados na FRULACT. ....	26
<b>Tabela 15.</b> Características intrínsecas das diferentes amostras analisadas. ....	28
<b>Tabela 16.</b> Valores de D e z de cada binómio de “ingredientação” com o desvio-padrão e média. ....	34

<b>Tabela 17.</b> Valores dos logaritmos dos valores de D obtidos nas diferentes temperaturas de ingredientação e pasteurização para cálculo dos valores de z.....	35
<b>Tabela 18.</b> Valores de D e z obtidos a partir do binómio de pasteurização a 98 °C para cada amostra estudada. ....	38
<b>Tabela 19- A1.</b> Média do logaritmo de UFC/g associada aos binómios de “ingredientação”, ao longo dos binómios de pasteurização correspondentes à amostra 1, acompanhada do desvio-padrão respetivo.....	49
<b>Tabela 20- A2.</b> Média do logaritmo de UFC/g associada aos binómios de “ingredientação”, ao longo dos binómios de pasteurização correspondentes à amostra 2, acompanhada do desvio-padrão respetivo.....	50
<b>Tabela 21- A3.</b> Média do logaritmo de UFC/g associada aos binómios de “ingredientação”, ao longo dos binómios de pasteurização correspondentes à amostra 3, acompanhada do desvio-padrão respetivo.....	51
<b>Tabela 22- B1.</b> Resultados da análise estatística do teste “Anova: fator único” entre os binómios de “ingredientação” da amostra 1 para os valores dentro do limite de deteção da técnica. ....	53
<b>Tabela 23- B2.</b> Resultados da análise estatística do teste “Anova: fator único” entre os binómios de “ingredientação” da amostra 2 para os valores dentro do limite de deteção da técnica. ....	53
<b>Tabela 24- B3.</b> Resultados da análise estatística do teste “Anova: fator único” entre os binómios de “ingredientação” da amostra 3 para os valores dentro do limite de deteção da técnica. ....	53
<b>Tabela 25- C1.</b> Cálculos intermédios para a obtenção do valor de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização da amostra 1, com as respetivas equações das retas e regressões. ....	54
<b>Tabela 26- C2.</b> Cálculos intermédios para a obtenção do valor de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização da amostra 2, com as respetivas equações das retas e regressões. ....	54
<b>Tabela 27- C3.</b> Cálculos intermédios para a obtenção do valor de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização da amostra 3, com as respetivas equações das retas e regressões. ....	55
<b>Tabela 28- C4.</b> Cálculos intermédios para a obtenção do valor de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização da amostra 1, com as respetivas equações das retas e regressões. ....	55

<b>Tabela 29- C5.</b> Cálculos intermédios para a obtenção do valor de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização da amostra 2, com as respetivas equações das retas e regressões. ....	55
---	----



## CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 Motivação e enquadramento do projeto

A segurança alimentar tem sido um assunto popular no mundo de hoje, devido às pessoas se encontrarem cada vez mais informadas e conscientes acerca do que comem e da sua saúde. De acordo com o site oficial da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020), a cada ano, alimentos inseguros são a causa de 600 milhões de casos de doenças e 420000 mortes. A OMS estimou que uma em cada dez pessoas adocece devido ao consumo de alimentos contaminados, todos os anos.

Microorganismos patogénicos, como as toxinas produzidas pelo *Bacillus cereus*, são a causa de muitas doenças de origem alimentar geradas pela ingestão de uma grande variedade de alimentos, portanto, a microbiologia alimentar é essencial para garantir a segurança e qualidade alimentar. Graças à microbiologia é possível identificar os microorganismos contidos nos alimentos e avaliar as suas características de crescimento e patogenicidade. Consequentemente, a causa da contaminação pode ser detetada e eliminada levando a um produto final mais seguro.

### 1.2 Apresentação da empresa

FRULACT- Ingredientes para a Indústria Alimentar S.A., é uma empresa da indústria alimentar localizada em Gemunde, Maia. Foi criada em 1987 pelo comendador Arménio Pinheiro Miranda, que havia anteriormente trabalhado na Longa Vida, e os seus dois filhos em Leça. O objetivo da criação da empresa passava por desenvolver preparações de frutas para laticínios, gelados, produtos de pastelaria, bebidas e alternativas vegetais para indústrias alimentares.

Começando a expandir-se rapidamente, foi em 1992 que a fábrica da zona industrial da Maia foi construída na sequência da aquisição de uma nova unidade fabril no Ferro em 1998. Mais tarde, em 1999, conseguiram levar a empresa para um novo continente, a África, inaugurando-se uma unidade em Marrocos e em 2000 na Tunísia, onde passou a fornecer para a indústria de laticínios do norte de África e Médio Oriente.

Em 2006 foi inaugurada uma unidade fabril de maiores dimensões em Tortosendo, Covilhã, e em 2009 foi adquirida uma nova unidade no sudeste de França tornando-se a FRULACT uma das empresas líderes no mercado europeu. Duas outras unidades foram inauguradas em

Marrocos e em Pretória, África do Sul, durante o ano de 2012. A empresa passou a estar representada em 5 continentes do mundo em 2017, quando uma unidade de produção foi inaugurada no Canadá.

Ao longo dos anos, a FRULACT venceu muitos prémios internacionais como o Prémio de Excelência em Pequenas e Médias Empresas em 1998, 1999, 2000 e 2001, o prémio de Inovação Agroindustrial de 2003, o Óscar da Exportação em 2005 da Câmara de Comércio Luso-Francesa e Setorial e mais recentemente, em 2019, foi eleita Empresa Internacional do Ano nos SAPCC - *ABSA Business Excellence Awards*.

Os seus clientes encontram-se muito bem representados no mercado atual por marcas consagradas como NESTLÉ, DANONE, UNILEVER, CLESA, LACTALIS, LACTOGAL, LECHE PASCUAL, entre muitas outras. Podemos afirmar, portanto, que a FRULACT é uma empresa que se encontra constantemente na vanguarda da inovação, sendo uma das maiores fabricantes de preparados à base de fruta do mundo.

### **1.3 Objetivos**

O objetivo desta dissertação é avaliar a eficácia de diferentes binómios tempo/temperatura na inativação dos esporos da bactéria *B. cereus* quando estes são inoculados em diferentes preparados de cereais tendo em conta o seu processo produtivo. Os preparados apresentam diferentes concentrações de açúcar, o qual pode influenciar a sua resistência térmica.

Os parâmetros de morte térmica, valor de D (min.) e valor de z (°C) irão ser calculados para cada um dos binómios tempo/temperatura aplicados no tratamento térmico, permitindo assim tirar conclusões acerca de quais os mais adequados para a eliminação desta bactéria. A partir da variação do pH e do valor de atividade da água dos preparados também será possível avaliar o desenvolvimento bacteriano, sendo que é expectável que em amostras que possuam valores de pH e atividade da água mais baixos haja inibição deste crescimento.

## 1.4 Organização da dissertação

A dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos, sendo o primeiro composto pela introdução. A introdução engloba três tópicos: Motivação e enquadramento do projeto, Apresentação da empresa e Objetivos da dissertação.

O segundo capítulo inclui os fundamentos teóricos, servindo para contextualizar temáticas abordadas ao longo da dissertação.

O terceiro capítulo diz respeito aos materiais e métodos, onde se indica todo o material e equipamentos que foram utilizados e os procedimentos seguidos.

O quarto capítulo expõe os resultados obtidos ao longo das análises realizadas e a sua discussão.

O quinto capítulo corresponde à conclusão e às perspectivas futuras, onde se encontram as correlações entre os resultados e as elucidações acerca dos mesmos, assim como aspetos que poderão ser estudados futuramente.

## CAPÍTULO 2- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1 Higiene e segurança alimentar

De acordo com a Comissão *Codex Alimentarius* (CAC), a organização internacional que define *standards* para alimentos, a segurança alimentar é definida como “a garantia de que o alimento não causará danos ao consumidor, quando preparado e consumido de acordo com o uso a que se destina” (Motarjemi, 2016).

As práticas de segurança alimentar sofreram uma grande evolução ao longo dos anos com o aumento do conhecimento científico e da tecnologia. Nos anos 90, deu-se a criação do HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*), Sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos, sistema este que funciona como um método de gestão da segurança alimentar na produção de alimentos. Todas as empresas do setor alimentar que se dediquem a qualquer fase da produção, transformação, armazenagem e/ou distribuição de géneros alimentícios necessitam de o desenvolver (ASAE, 2017; Motarjemi, 2016).

Nos dias de hoje, da totalidade dos problemas mundiais de saúde pública, aqueles que apresentam causas alimentares mostram-se como dos mais preocupantes, sendo que as intoxicações por organismos patogénicos são as principais preocupações da indústria alimentar (Morya et al., 2020).

Os fatores mais significativos que contribuem para as intoxicações alimentares são denominados de “fatores de risco de doenças transmitidas por alimentos” pela *US Food and Drug Administration* (FDA). Estes fatores encontram-se divididos em cinco categorias: modo impróprio de cozinhar, fonte insegura de alimentos, temperatura de manutenção inadequada, uso de equipamentos contaminados e higiene pessoal reduzida (Morya et al., 2020). No entanto, a segurança alimentar não se limita aos agentes biológicos, mas inclui também uma série de outras ameaças à saúde, como perigos físicos (vidros, metais, pedras) e químicos (resíduos de pesticidas, produtos químicos, medicamentos veterinários) (Jackson, 2009).

Um dos principais progressos nesta área dos últimos anos foi o desenvolvimento de normas privadas, como a ISO 22000, desenvolvidas para possibilitar uma verificação mais completa e eficaz das operações alimentares (Motarjemi, 2016).

## 2.2 Microbiologia alimentar

A segurança dos produtos alimentares depende da capacidade de identificação e rastreamento de microorganismos patogénicos. É por este motivo que a microbiologia alimentar é essencial para o seu controlo, tendo esta vindo a evoluir.

Métodos de conservação de alimentos, como a salga, a salmoura e a fumagem, já são utilizados desde há muitos milhares de anos. Apesar de serem métodos minimamente eficientes e terem sido desenvolvidos antes da existência da refrigeração, também geram preocupações com a segurança. Isto deve-se ao facto das bactérias possuírem a capacidade de se tornarem resistentes a esses métodos tradicionais, podendo oferecer riscos à saúde (Lopez et al., 2018).

Até há meio século atrás, as bactérias patogénicas de origem alimentar de que se tinha conhecimento eram essencialmente a *Salmonella*, o *Staphylococcus aureus* e o *Clostridium botulinum* (Custer, 2014). Já o *Campylobacter* spp. e a *Escherichia coli* produtora da shiga toxina, por exemplo, foram identificadas muito mais tarde. Mais recentemente, descobriu-se também que microorganismos benignos como o *Citrobacter* e algumas estirpes da *E. coli* são capazes de adquirir fatores de virulência e tornarem-se patogénicos (Custer, 2014).

Das doenças transmitidas por alimentos, as mais comuns são a salmonelose, o botulismo, a febre tifoide e a cólera. Já os microorganismos que podem causar intoxicações alimentares são as bactérias, os vírus, as fitotoxinas e as micotoxinas (Morya et al., 2020).

A Internet e a capacidade de se poderem estabelecer redes de bases de dados, como a FoodNet, facilitaram a descoberta de surtos de doenças transmitidas por alimentos espalhados por uma vasta região geográfica (Center for Disease Control, 2004). Apesar da obrigatoriedade da notificação destes surtos ser uma realidade na União Europeia desde 2005, sendo os dados fornecidos pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC), Portugal apresenta escassez de dados disponíveis (Bento, 2020; Food, Authority, & Centre, 2014).

Também ferramentas sofisticadas como o ComBase, oferecem-nos a possibilidade de poder avaliar com precisão os riscos associados aos perigos microbianos de origem alimentar (Adams, 2014).

## 2.3 Bactérias

De acordo com o sistema de classificação taxonómica de organismos vivos proposto por Carl Woese e a sua equipa (Woese et al., 1990), existem 3 domínios de organismos: bacteria, archaea e eukarya. Dentro destes domínios, 6 reinos têm lugar: animalia, fungi, plantae, protista, eubacteria e archaeobacteria.

Ambos os reinos archaeobacteria e eubacteria detêm organismos procariotas e, portanto, unicelulares. Contudo, o reino archaeobacteria, é composto por procariotas primitivos incomuns que são capazes de sobreviver a condições extremas como elevadas temperaturas e ambientes sem oxigénio. Alguns exemplos destes organismos são os metanogénicos, termófilos e os halófilos. Já o reino eubacteria engloba a grande maioria das bactérias existentes e que são mais comumente encontradas nos ecossistemas terrestres (Raven et al., 2002).

As bactérias são dos organismos mais antigos, estruturalmente simples e abundantes do mundo. Apesar de possuírem diversas semelhanças, como a reprodução por divisão binária e a organização procariota, também conseguem ser muito distintas apresentando tamanhos, estruturas e características bioquímicas e metabólicas bastante diferentes entre si (Bruce Alberts et al., 2003).

As características mais usadas para a sua classificação são: a mobilidade, a morfologia, a resistência térmica, a capacidade de fotossíntese e a capacidade de formarem esporos (David Rifkind, 2005). Um exemplo de classificação de acordo com uma característica extrínseca é a resposta ao oxigénio, como apresentado na tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação de bactérias de acordo com as suas relações com o oxigénio (retirado de: Goel, 2017).

Categoria	Ambiente		Efeito do oxigénio
	Aeróbio	Anaeróbio	
Aeróbio obrigatório	Crescimento	Sem crescimento	Necessário (utilizado para respiração aeróbia)
Microaerofílico	Crescimento se os níveis de O <sub>2</sub> não forem muito elevados	Sem crescimento	Necessário, mas a níveis abaixo de 0.2 atm
Anaeróbio obrigatório	Sem crescimento	Crescimento	Tóxico
Anaeróbio facultativo	Crescimento	Crescimento	Não é necessário para haver crescimento, mas é utilizado quando disponível
Anaeróbio aerotolerante	Crescimento	Crescimento	Não é necessário e não é utilizado

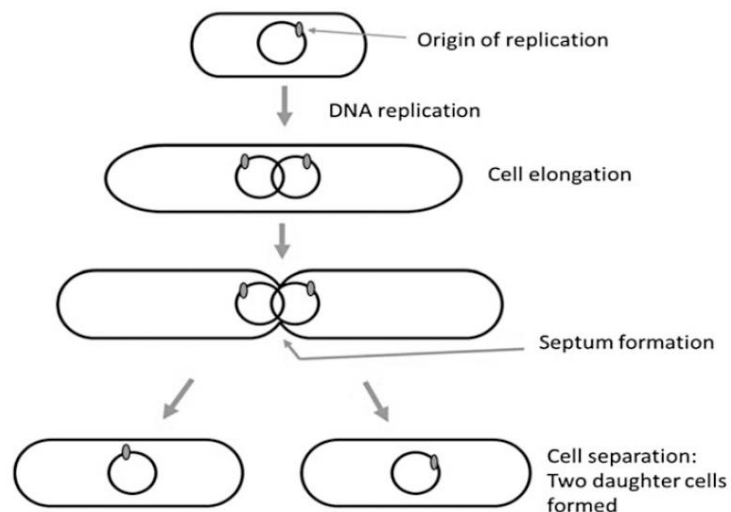
## 2.3.1 Reprodução bacteriana

### 2.3.1.1 Divisão binária

As bactérias, sendo organismos procariotas unicelulares, não podem reproduzir-se por reprodução sexuada. No entanto, é possível haver transferência genética entre si através dos processos de conjugação, transformação e transdução (Lodé, 2012).

Apesar de as bactérias apresentarem mais formas de reprodução, como o *budding* e a regeneração, a mais comum é um processo simples designado de divisão binária (Chien et al., 2012). Este processo de reprodução assexuada consiste na divisão da célula em duas células de tamanhos iguais ou aproximadamente iguais (Raven et al., 2002).

O processo começa com o aumento de tamanho da célula bacteriana. Em seguida, dá-se a replicação do cromossoma circular (DNA) dentro da célula e esta começa a alongar-se. Este alongamento, que é devido ao fornecimento de nutrientes, temperatura e pH adequados, vai levar também à duplicação de todos os seus componentes, como os ribossomas e os plasmídeos. Forma-se, entretanto, um septo no seu centro, que depois de se encontrar completamente constituído, resulta na geração de duas células (citocinese). Cada célula possui agora uma cópia do DNA da célula de origem (Chien et al., 2012; Goel, 2017).



**Figura 1.** Reprodução bacteriana por divisão binária (retirado de: Goel, 2017).

### 2.3.1.2 Esporulação

A capacidade de apresentar dormência em forma de esporo é manifestada por diversas espécies de bactérias, sendo que cada filo bacteriano é capaz de produzir um tipo de esporo diferente. Os quatro filios mais estudados têm sido o Firmicutes (endósporos), Actinobactérias (exósporos), Cianobactérias (acinetos) e  $\delta$ -Proteobacteria, gene Myxococcus (corpos frutíferos). Dentro do filo Firmicutes, as espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são as mais comumente estudadas (Paul et al., 2019).

Este processo denominado de esporulação, serve como mecanismo de defesa de células bacterianas a condições adversas que as células vegetativas não conseguem tolerar, como temperaturas extremas e carência de nutrientes (Warren & Gould, 2006).

Os esporos são células dormentes, sendo que possuem a capacidade de se manterem inertes por longos períodos de tempo, tendo já sido reportado conseguirem sobreviver entre 34 anos a 250 milhões de anos (Goel, 2017), e quando as condições se tornam favoráveis retornam o seu ciclo de vida.

O processo de esporulação começa com a fosforilação do regulador de transcrição seguida pela divisão celular da célula vegetativa. Um precursor do endósporo (pré-esporo) sofre engolfamento levando à formação do córtex seguida pela formação da camada externa do esporo (*spore coat*). Por último, ocorre a maturação deste e lise celular, ficando o esporo livre.

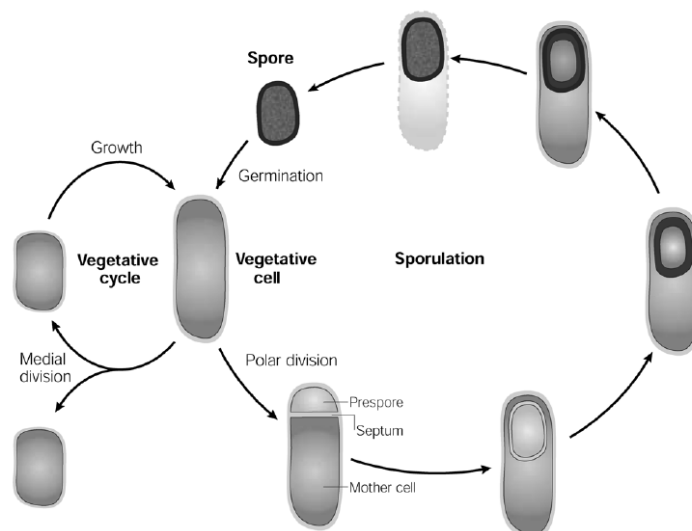


Figura 2. Ciclo do processo de esporulação de *B. cereus* (retirado de: Warren & Gould, 2006).



### 2.3.2 *Bacillus cereus*

Dentro da família Bacillaceae existe o género designado de *Bacillus* que contém a espécie de bactérias *B. cereus*. Esta pertence a um grupo denominado de *Bacillus cereus sensu lato* cujas restantes espécies são *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycoides* e *B. cytotoxicus* (Setlow & Johnson, 2014).

*B. cereus* é uma bactéria gram positiva, aeróbia facultativa, ubíqua na natureza, sendo que se encontra presente no solo e consegue ser facilmente disseminada para muitos tipos de alimentos, tanto de origem vegetal (ex: aveia e arroz), como animal, por exemplo para os laticínios. Esta existe enquanto formadora de esporos e célula vegetativa na natureza e enquanto célula vegetativa unicamente aquando da colonização do corpo humano (Bottone, 2010).

Apesar da grande maioria das estirpes de *B. cereus* serem mesófilas, possuindo uma temperatura ótima de crescimento entre 28° e 40 °C, existem também estirpes psicrótróficas (Callegan et al., 2002).

Os seus esporos são resistentes a temperatura elevadas, como a temperatura de pasteurização de alimentos, produzindo vários tipos de toxinas, porém as que apresentam maior patogenicidade são a toxina emética e a toxina diarreica (Stenfors et al., 2008). Estas apresentam diferenças significativas entre si, dado que a toxina diarreica é produzida pelas células vegetativas no intestino e é possível destruí-la a temperaturas superiores a 56 °C enquanto que a toxina emética é ingerida diretamente através de alimentos contaminados e resiste a temperaturas de 126 °C (Gibbert, 1979; Granum, 1994).

As infeções gastrointestinais que estas toxinas podem causar são o síndrome diarreico e o síndrome emético, contudo o *B. cereus* também pode causar infeções sistémicas, como septicémia e endocardite, e infeções locais como conjuntivite e osteomielite (Yilmaz et al., 2012).

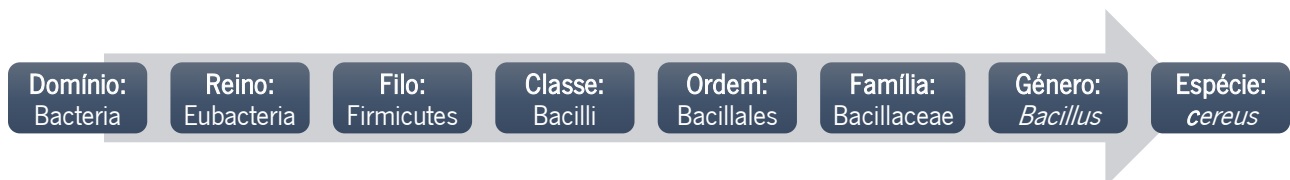


Figura 3. Taxonomia da bactéria *B. cereus*.

## 2.4 Fatores que afetam o crescimento bacteriano

Existe a possibilidade de haver crescimento bacteriano durante todas as etapas de processamento de um alimento. Subsiste tanto a possibilidade da matéria-prima já se encontrar contaminada desde o início, como de o microorganismo (bactéria, fungo ou levedura) poder entrar em contacto com o alimento numa fase mais tardia. Quando isto acontece, se a bactéria dispuser de condições favoráveis ao seu desenvolvimento, ela vai reproduzir-se. Se a reprodução levar ao surgimento de um número elevado de células bacterianas que seja considerado crítico, o alimento não se encontrará em condições para consumo. Isto poderá provocar consequências à saúde humana, tais como patologias graves.

Existem diversos fatores que são fulcrais para a ocorrência do crescimento bacteriano. Os principais fatores intrínsecos, diretamente relacionados com o alimento em si, são a atividade da água, a acidez, o potencial oxidação/redução e a composição química do alimento. Já os fatores extrínsecos, relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra, são a temperatura, a humidade relativa e a composição do meio.

### 2.4.1 Fatores intrínsecos

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

O conceito de atividade da água já data de há mais de 100 anos. Apesar disso, foi apenas em 1957 que William James Scott estudou a relação entre o crescimento de microorganismos e a atividade de água do meio de crescimento (Syamaladevi et al., 2016) e demonstrou que é a atividade da água e não o conteúdo em água de um sistema alimentar que regula o crescimento microbiano e a produção de toxinas (Barbosa-Cánovas et al., 2007). Segundo Scott (1957), a atividade da água ( $a_w$ ) consiste na razão entre a pressão de vapor de água da solução ( $p$ ) e a pressão de vapor de água do solvente ( $p_0$ ) à mesma temperatura.

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

Já no contexto alimentar, pode também ser definida como a razão entre a pressão do vapor de água no produto alimentar ( $p_v$ ) e a pressão de vapor de água saturado ( $p_{vs}$ ), à mesma temperatura do produto (Syamaladevi et al., 2016).

$$a_w = \frac{p_v}{p_{vs}} \quad (\text{Equação 2})$$

A gama de valores de  $a_w$  que os alimentos podem possuir é muito alargada. Os produtos frescos como frutas, vegetais, carne e peixe, geralmente apresentam valores de quase 1, enquanto que produtos secos e desidratados, como massa e especiarias, são dos alimentos que possuem valores mais baixos, apresentando-se muito perto do 0. Quanto mais baixa é a atividade da água, mais microbiologicamente estável é o alimento (Syamaladevi et al., 2016). Na tabela 2 encontram-se representados exemplos de valores de  $a_w$  de alimentos.

**Tabela 2.** Atividade da água representativa de alguns alimentos (retirada de: Ross & Nichols, 2014)

Alimento	Atividade da água típica
Leite, fruta, vegetais	0.995 - 0.998
Carne e peixe frescos	0.990 - 0.995
Carne cozinhada, salmão fumado frio	0.965 - 0.980
Queijo de barrar	0.95
Pão	0.90 - 0.95
Conservantes, molho de soja	0.80
Peixe salgado, mel	0.75
Fruta desidratada	0.75 - 0.6
Cereais, produtos de pastelaria, manteiga de amendoim	0.70 - 0.80
Gelo a -40 °C	0.68
Massa seca, especiarias, leite em pó	0.20 - 0.60
Alimentos liofilizados	0.10 - 0.25

O valor mínimo de  $a_w$  em que microorganismos conseguem crescer é de 0.60 (Beuchat et al., 2013), sendo que a maioria das bactérias não consegue crescer a uma atividade da água abaixo de 0.85-0.86, apenas bactérias halofílicas conseguem crescer em valores de  $a_w$  de 0.75 (Barbosa et al., 2007). Geralmente as bactérias Gram-negativas apenas conseguem crescer em

ambientes com  $a_w > 0.95$ , ao contrário das bactérias Gram-positivas que apresentam capacidade em crescer em valores mais baixos como 0.90 (Ross & Nichols, 2014).

Na tabela 3 encontra-se a gama de valores de  $a_w$  em que ocorre o crescimento de diversas espécies bacterianas.

**Tabela 3.** Valores de  $a_w$  propícios ao crescimento de diversas espécies bacterianas (retirado de: Baptista & Venâncio, 2003).

Organismo	Mínimo	Ótimo	Máximo
<i>Campylobacter</i> spp.	0.98	0.99	
<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	0.97		
<i>Shigella</i> spp.	0.97		
<i>Escherichia coli</i> Entero-hemorrágica	0.95	0.99	
<i>Salmonella</i> spp.	0.94	0.99	> 0.99
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.94	0.98	0.99
<i>Bacillus cereus</i>	0.93		0.99
<i>Clostridium botulinum</i> tipo A e B	0.93		
<i>Clostridium perfringens</i>	0.943	0.95-0.96	0.97
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.92		
<i>Staphylococcus aureus</i> crescimento	0.83	0.98	0.99
<i>Staphylococcus aureus</i> toxina	0.88	0.98	0.99

#### 2.4.1.2 Acidez

A acidez é uma característica medida numa escala numérica denominada de pH. O pH corresponde ao logaritmo negativo da concentração do ião de hidrogénio ( $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ ). A concentração dos iões de hidrogénio num sistema encontra-se correlacionada com a natureza e concentração dos ácidos presentes. É por este motivo que o pH é definido como a medida da acidez de um produto (Coton & Leguerinel, 2014).

A generalidade dos alimentos apresenta um valor de pH ácido, salvo raras exceções que poderão possuir pH básico, como a clara de ovo ( $7.6 < \text{pH} < 9.5$ ) ou o tofu ( $\text{pH} = 7.2$ ). Exemplos de alimentos cujo pH poderá ser eventualmente neutro são o leite e a água pura (Joye, 2018).

**Tabela 4.** Valores de pH de alguns alimentos comuns (retirado de: Coton & Leguerinel, 2014).

Alimentos		pH
Laticínios	Manteiga	6.1 - 6.4
	Leite	6.3 - 6.8
	Queijo (cheddar)	5.9
	Iogurte	3.8 - 4.2
Carne e derivados	Vaca (picada)	5.1 - 6.4
	Frango	6.2 - 6.4
	Clara de ovo	7.6 - 9.5
	Gema de ovo	6.0 - 6.8
Peixe e marisco	Peixe (maioria das espécies)	6.6 - 6.8
	Salmão	6.1 - 6.3
	Camarão	6.8 - 7.0
	Atum	5.2 - 6.1
Frutas e vegetais	Maçã	2.9 - 3.3
	Banana	4.5 - 4.7
	Lima	1.8 - 2.0
	Batata	5.3 - 5.6

Diferentes tipos de microorganismos crescem e desenvolvem-se melhor em gamas de pH diferentes, sendo que geralmente as bactérias crescem mais rapidamente entre valores de pH de 6.0 a 8.0 (Adams, 2014). Usualmente, bactérias patogénicas não crescem, ou crescem muito devagar, em ambientes de pH inferior a 4.6, podendo haver sempre exceções (CRFSFS, 2003). As bactérias Gram-negativas crescem melhor entre valores de pH de 4.0 e 8.5 e as bactérias Gram-positivas entre valores de 4.5 e 9.0 (Coton & Leguerinel, 2014).

**Tabela 5.** Exemplo das gamas de pH em que ocorre crescimento de algumas espécies bacterianas (retirado de: Coton & Leguerinel, 2014).

Microorganismo	Mínimo	Ótimo	Máximo
<i>Bacillus cereus</i>	4.9	6.0-7.0	8.8
<i>Campylobacter</i> spp.	4.9	6.5-7.5	9
<i>Clostridium botulinum</i>	4.6		8.5
<i>Lactobacillus</i> spp.	3.8	5.5-6.5	8.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.4	7.0	9.4
<i>Shigella</i> spp.	4.9		9.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0	6.0-7.0	10.0

A letalidade do tratamento térmico de um alimento é afetada consideravelmente pelo pH do mesmo. Para inativar microorganismos de um alimento cujo pH seja baixo, não são necessárias temperaturas tão elevadas quando comparado com um alimento cujo pH seja mais elevado (CRFSFS, 2003). Também a interação do pH com outros fatores intrínsecos do alimento, como a  $a_w$  e a temperatura, poderá inibir o crescimento de organismos tanto patogénicos como não patogénicos (Baptista & Venâncio, 2003).

No caso do pH e da  $a_w$ , o seu efeito combinado, para controlar o crescimento de microorganismos, é superior quando comparado ao efeito gerado por cada um destes sozinhos. Pode haver, portanto, um controlo do crescimento microbiano eficaz em níveis que seriam considerados inseguros para ambos aquando de aplicados individualmente.

O *food code* da EFSA (2014), apresenta dados que podem ser usados para se relacionar o efeito dos valores de pH com os da  $a_w$  e determinar se um alimento requer ou não tratamento térmico, com a aplicação de um binómio tempo/temperatura, para prevenir o crescimento microbiano. Estes encontram-se seguidamente demonstrados nas tabelas 6 e 7.

**Tabela 6.** Interação do pH e da  $a_w$  para o controlo de esporos, em alimentos sujeitos a um tratamento térmico, para destruir células vegetativas, e que foram subsequentemente embalados.

Valores de $a_w$	pH: $\leq 4.6$	pH: $>4.6-5.6$	pH: $>5.6$
$\leq 0.92$	Alimento não-TCS*	Alimento não-TCS	Alimento não-TCS
$>0.92-0.95$	Alimento não-TCS	Alimento não-TCS	PA*
$>0.95$	Alimento não-TCS	PA	PA

\*Alimento TCS significa alimento controlado por binómio tempo/temperatura (*time/temperature control for safety food*)

\*PA significa avaliação do produto requerida (*product assessment required*)

**Tabela 7.** Interação do pH e da  $a_w$  para o controlo de esporos, em alimentos não sujeitos a um tratamento térmico ou sujeitos a um tratamento térmico, mas não embalados.

Valores de $a_w$	pH: $<4.2$	pH: $4.2-4.6$	pH: $>4.6-5.0$	pH: $>5.0$
$<0.88$	Alimento não-TCS*	Alimento não-TCS	Alimento não-TCS	Alimento não-TCS
$0.88-0.90$	Alimento não-TCS	Alimento não-TCS	Alimento não-TCS	PA*
$>0.90-0.92$	Alimento não-TCS	Alimento não-TCS	PA	PA
$>0.92$	Alimento não-TCS	PA	PA	PA

\*Alimento TCS significa alimento controlado por binómio tempo/temperatura (*time/temperature control for safety food*)

\*PA significa avaliação do produto requerida (*product assessment required*)

Como pode ser observado na tabela 6, a partir de valores mais elevados,  $a_w$  de 0.92 e pH de 4.6, as condições são consideradas seguras para o tratamento térmico conseguir destruir todos os microorganismos e o alimento ser, em seguida, embalado. Contudo, as bactérias formadoras de esporos poderão não ser inativas devido à sua termorresistência, como falado anteriormente no ponto 2.3.1.2.

Já a tabela 7, que diz respeito a produtos que não são sujeitos a um tratamento térmico ou que são sujeitos a um tratamento térmico mas não são embalados, demonstra que, normalmente, esses produtos requerem valores inferiores. Valores de  $a_w$  inferiores a 0.88 ou valores de pH inferiores a 4.2, mais propriamente, para serem considerados seguros.

### 2.4.1.3 Potencial de oxidação/redução

O potencial de oxidação/redução (Eh) é a medida que mede a tendência que uma substância tem para adquirir ou perder elétrons. O substrato que os adquire é denominado de reduzido e o que os perde de oxidado (Baptista & Venâncio, 2003).

Existe um sistema de classificação de microorganismos de acordo com a sua gama de crescimento do potencial oxidação/redução, que os divide em três grupos, como apresentado na tabela 8.

**Tabela 8.** Classificação de microorganismos de acordo com a gama de crescimento do Eh (retirado de: Pinto & Pereira, 2016).

Classificação	Gama de crescimento (mV)
Aeróbios	+300 a +500
Aeróbios facultativos	-100 a +300
Anaeróbios	-250 a +100

Os valores de Eh dos alimentos são muito variáveis, como podemos observar na tabela 9. Apesar da sua medição poder ser usada em combinação com outros fatores com o fim de se avaliar o crescimento de microorganismos, limitações como a baixa precisão das medições torna este fator bastante variável podendo levar a falsas conclusões (CRFSFS, 2003).

**Tabela 9.** Potenciais oxidação/redução (Eh) de alguns alimentos (retirado de: Prévost & Brillet-Viel, 2014).

Alimento	Eh (mV)
Leite	+100 a +400
Queijo (camembert)	-350 a -259
Queijo (cheddar)	-300 a -140
Iogurte	-150 a +410
Peixe (pescada)	+210 a +250
Carne (bife de vaca)	+300 a +330

O controlo da oxidação/redução num alimento pode fazer o crescimento da sobrevivência de microorganismos variar e influenciar também a resistência celular e a patogenicidade a diferentes *stresses*. Apesar disso, o papel do Eh na inativação térmica microbiana é complexo e ainda não foi claramente compreendido. Isto deve-se ao facto de depender de muitos fatores, desde o próprio microorganismo ao método usado para ajustar o potencial redox (Prévost & Brillet-Viel, 2014).

#### 2.4.1.4 Composição química do alimento- conteúdo em nutrientes

Os alimentos possuem diversos tipos de nutrientes que favorecem o crescimento de microorganismos. Estes microorganismos usufruem dos alimentos para extrair elementos químicos que vão originar a biomassa microbiana e substrato que pode ser usado como fonte de energia (Adams et al., 2008).

Dos nutrientes que eles necessitam destacam-se a água, uma fonte de energia, azoto, vitaminas e sais minerais. Diferentes compostos podem ser utilizados como fonte de energia, como é o caso de hidratos de carbono, álcoois e aminoácidos. Polissacarídeos como o amido e a celulose, são capazes de metabolizar os hidratos de carbono complexos em açúcares simples. No entanto, a maior parte deles utiliza diretamente hidratos de carbono simples como a glucose, sendo que lípidos também são utilizados (Baptista & Venâncio, 2003; CRFSFS, 2003; Jay, 2005).

Para se medir a concentração de açúcares presentes nos alimentos é usada uma escala designada por escala Brix (°Bx). Esta é numericamente igual à percentagem de açúcar e outros sólidos dissolvidos na solução, sendo que, por exemplo, uma solução que apresenta 25 graus Brix possui 25 g de açúcar (e outros solutos) e 75 g de água por 100 g de solução (Ball, 2006).



A grande maioria dos microorganismos usa os aminoácidos como fonte de azoto, apesar da ureia, o amoníaco, a creatinina e as metilaminas serem também usados para esse fim (CRFSFS, 2003).

As vitaminas são nutrientes comumente encontrados nos alimentos em quantidade suficiente para o crescimento de microorganismos. Porém, as necessidades nutricionais não são iguais para todos os microorganismos, sendo que as bactérias Gram-positivas necessitam de uma ou mais vitaminas para conseguirem crescer ao contrário das Gram-negativas que são capazes de sintetizar os seus próprios fatores de crescimento (Campos, 2018).

Quanto aos sais minerais, apesar destes serem usados em quantidades reduzidas, são essenciais ao crescimento de microorganismos devido ao seu envolvimento em reações enzimáticas. Alguns dos mais importantes são o sódio, o potássio, o cálcio, o magnésio, o ferro, o manganésio, o fosforo e o enxofre (Baptista & Venâncio, 2003).

#### **2.4.1.5 Estrutura biológica do alimento**

As estruturas biológicas dos alimentos, como as cascas, peles, carcaças, conchas e membranas, funcionam como uma barreira física à entrada de microorganismos patogénicos e possível degradação posterior. Estas estruturas são normalmente constituídas por macromoléculas resistentes à degradação e fornecem um ambiente inóspito para microorganismos. Possuem uma atividade da água baixa, escassez de nutrientes prontamente disponíveis e, por vezes, compostos antimicrobianos (Adams et al., 2008).

#### **2.4.1.6 Compostos antimicrobianos**

Existem diversos tipos de alimentos que possuem substâncias naturais intrínsecas na sua constituição com propriedades antimicrobianas. Alguns exemplos destes compostos são a lisozima no ovo, a alicina no alho, a lactoferrina no leite e o ácido benzóico nas amoras, ameixas e morangos (Baptista & Venâncio, 2003).

Normalmente, a concentração destes compostos nos alimentos é relativamente baixa, tornando o efeito antimicrobiano muito ténue. É benéfico, portanto, a conjugação com outros fatores, como o pH e a atividade da água, para potenciar este efeito (CRFSFS, 2003).

## 2.4.2 Fatores extrínsecos

Os fatores extrínsecos que afetam o crescimento bacteriano caracterizam-se por serem fatores independentes ao alimento, ou seja, apenas relacionados com o meio envolvente do mesmo. Os principais fatores são a temperatura, a humidade relativa e a composição do meio.

### 2.4.2.1 Temperatura

A temperatura é um dos fatores fulcrais para o crescimento de microorganismos devido ao facto destes não crescerem todos na mesma gama de temperaturas. Existe, por esse motivo, um sistema de classificação de microorganismos de acordo com as suas temperaturas ótimas de crescimento, como se encontra demonstrado na tabela 10.

**Tabela 10.** Classificação de bactérias quanto à gama de temperaturas em que ocorre crescimento (retirado de: Jay, 2005).

Microorganismos	Temperatura (°C)		
	Mínima	Ótima	Máxima
Termófilos	40 a 45	55 a 75	60 a 90
Mesófilos	5 a 15	30 a 45	35 a 47
Psicrófilos	-5 a 5	12 a 15	15 a 20
Psicotróficos	-5 a 5	25 a 30	30 a 35

A grande maioria das bactérias patogénicas são mesófilas, sendo que existem exceções como a *Listeria monocytogenes*, a *Yersinia enterocolitica* e o *Clostridium botulinum* tipo E, que possuem comportamento psicrófilo (Húngaro et al., 2014). Podemos observar os valores de alguns destes exemplos na tabela 11.

**Tabela 11.** Gama de temperaturas a que crescem diversas espécies bacterianas (retirado de: Jay, 2005).

Microorganismos	Temperatura (°C)		
	Mínima	Ótima	Máxima
<i>Bacillus cereus</i>	5	28 a 40	55
<i>Campylobacter</i> spp.	32	42 a 45	45
<i>Clostridium botulinum</i> tipo A e B	10 a 12	30 a 40	50
<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	3 a 3.3	25 a 37	45
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	30 a 37	45
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	35 a 40	48
<i>Shigella</i> spp.	7	37	45 a 47
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-1	28 a 30	42

A diminuição da temperatura leva ao aumento do tempo da fase lag (uma das fases do crescimento bacteriano, definida no ponto 2.5.4.) em microorganismos patogénicos alimentares, culminando no aumento do tempo de prateleira. É, por isso, um dos métodos mais usados para preservar o tempo de prateleira de alimentos minimamente processados, pasteurizados e crus. Baixas temperaturas inibem o desenvolvimento de mesófilos e termófilos, mas não de psicrófilos. O crescimento destes microorganismos pode ser inibido pelo ajuste de outros parâmetros intrínsecos (Húngaro et al., 2014), como a junção de aditivos à composição química do alimento, como por exemplo o sorbato (González-Fandos & Dominguez, 2007) e extrínsecos, como a aplicação de atmosferas modificadas (Dechemi et al., 2005).

#### **2.4.2.2 Humidade relativa**

A humidade relativa é um parâmetro que se encontra diretamente relacionado com a atividade da água, mas também com a temperatura. Quando alimentos que possuem baixa  $a_w$  são armazenados em ambientes cuja humidade relativa é elevada, a água é transferida da fase gasosa para o alimento. Logo, a  $a_w$  do alimento vai aumentar e possibilitar o crescimento microbiano no mesmo (Adams et al., 2008). Da mesma forma, alimentos com  $a_w$  elevada perdem humidade quando colocados em ambientes com baixa humidade relativa.

Também, geralmente, quanto mais elevada for a temperatura menor a humidade relativa, e vice-versa. Alimentos que sofrem deterioração à sua superfície por fungos, leveduras e certas bactérias devem ser armazenados em condições de baixa humidade relativa (Jay, 2005).

#### **2.4.2.3 Composição do meio- presença e concentração de gases**

Existem alguns gases presentes no ambiente que apresentam a capacidade de prevenir o crescimento microbiano. O dióxido de carbono, o ozono e o oxigénio são compostos com efeitos tóxicos diretos que podem inibir o crescimento e proliferação dos microorganismos. Já o azoto possui efeitos inibitórios indiretos devido a conseguir alterar a ecologia do ambiente microbiano (CRFSFS, 2003). Diversas tecnologias emergentes aliam o controlo da atmosfera com o controlo da temperatura para inibir o crescimento microbiano. Alguns exemplos são a embalagem em atmosfera modificada, a embalagem em atmosfera controlada e a armazenagem em atmosfera controlada (Baptista & Venâncio, 2003).

## 2.5 Processamento térmico: Fatores que afetam a termorresistência de *Bacillus cereus*

Dependendo das características intrínsecas de um alimento, como falado anteriormente no ponto 2.2.1, este pode comportar-se de maneiras diferentes na inativação de microorganismos com recurso ao processamento térmico. No caso da inativação do *B. cereus*, já foram realizados múltiplos estudos em que se observaram diferenças significativas por influência de características intrínsecas das amostras, como a atividade da água, a concentração de açúcares e o pH.

Como tal, encontram-se agrupados na tabela 12 os valores da temperatura,  $a_w$  e o valor de D, o parâmetro de morte térmica correspondente ao tempo de redução decimal, explicado mais á frente no ponto 2.6, de quatro desses estudos.

**Tabela 12.** Resultados da inativação térmica de esporos de *B. cereus* em amostras com diferentes valores de  $a_w$ , pH e concentração de açúcares obtidos em diferentes estudos.

	Temperatura (°C)	$A_w$	Valor de D (min.)					
(Gaillard et al., 1998)	95	1.00	pH=6.5	2.4	pH=5.5	1.0	pH=4.5	0.5
	95	0.95		5.0		2.5		1.4
	95	0.86		13.8		14.5		7.8
	85	1.00		63.4		13.1		5.0
	85	0.86		68.9		91.5		33.9
(Mazas et al., 1999)	92	0.99	pH=7.6	3.28	pH=7.28			
	92	0.98		3.25		2.22		
	92	0.96		4.50		2.34		
(Coroller et al., 2001)	95	1.00	pH=7.0	4.00				
	95	0.98		5.00				
	95	0.90		11.2 (glicerol) 10.5 (glicose) 27 (sacarose)				
(Samapun do et al., 2011)	85	0.99	pH=5.0	42				
	85	0.92		270				
	85	0.99	pH=6.5	148.4				
	85	0.98		7				

A partir destes resultados, podemos afirmar que, geralmente, quanto mais elevado o valor da temperatura e mais baixo o valor do pH e da  $a_w$ , mais reduzido é o valor de D, ou seja, mais rapidamente ocorre a inativação térmica de *B. cereus*.

### 2.5.1 Atividade da água

Como podemos observar pelos exemplos expostos na tabela 12, o valor de D (tempo de redução decimal) aumenta com o decréscimo dos valores da atividade da água. Ou seja, a termorresistência do *B. cereus* aumenta quando há decréscimo da  $a_w$  na amostra.

Geralmente, valores reduzidos de  $a_w$  conferem maior resistência ao tratamento térmico nas células microbianas, sendo que este comportamento pode dever-se à "proteção cruzada" que o *stress* osmótico revela contra o *stress* de temperatura. No entanto, a temperatura mínima para haver crescimento de muitos organismos patogénicos de origem alimentar é aumentada pela diminuição da  $a_w$ . Isto levanta a possibilidade de que a base destes efeitos esteja na própria "energia" da água, isto é, se a energia cinética das moléculas da água intervém no efeito letal da temperatura, então a redução da "energia" da água pelos solutos pode ter o mesmo efeito que a redução da temperatura (Ross & Nichols, 2014)

Valores reduzidos de  $a_w$  provocam atrofia celular e um espessamento da membrana celular resultando na redução do tamanho das células (António Sérgio Alves Rebelo, 2014).

### 2.5.2 pH

É comumente conhecido que valores de pH baixos reduzem a resistência térmica dos esporos (Leguerinel & Mafart, 2001). A grande generalidade dos microorganismos é mais resistente ao calor no seu pH ótimo de crescimento, sendo geralmente 7.0. À medida que o pH é reduzido ou aumentado a partir deste valor ideal, há um aumento consequente na sensibilidade ao calor. O processamento térmico de alimentos com valores de pH baixos (ácidos) apresenta a vantagem de necessitar de ser aplicado menos calor para se obter a esterilização em comparação com alimentos neutros ou próximos da neutralidade (Jay, 2005).

### 2.5.3 Composição da matriz

A presença de açúcares no meio de suspensão causa um aumento na termorresistência de microorganismos que lá se encontram suspensos. Este efeito é, pelo menos em parte, devido ao decréscimo da atividade da água causada pela elevada concentração de açúcares (Jay, 2005).

De acordo com Coroller et al. (2001), para um valor fixo de atividade da água, o grau de proteção térmico depende do tipo de "depressor" usado, sendo que o depressor é um soluto usado para reduzir a  $a_w$ , como açúcares (sacarose, glucose e frutose) sendo também utilizados

polióis e sais minerais (Torrezan et al., 1999). Neste estudo, a sacarose demonstrou um efeito protetor mais eficaz que o glicerol e a glucose, sendo que este efeito já havia sido testemunhado em estudos prévios (Baird-Parker et al., 1970; Mazas et al., 1999).

Podem existir vários motivos para estas ocorrências. A entrada de glicerol e glucose para o interior das células limita a plasmólise, que também é responsável pela proteção dos esporos ao calor. No caso da sacarose esta limitação não existe, sendo que esta não é absorvida pelas células. Outra explicação para o efeito protetor de um depressor no meio de aquecimento pode ser a ocorrência de inibição da germinação de esporos. Esta é geralmente inibida na ausência de humidade ou numa solução de soluto não penetrante. Os esporos que não chegam a germinar são protegidos durante o tratamento térmico e podem germinar e crescer posteriormente.

#### 2.5.4 Curva de crescimento

A típica curva de crescimento bacteriano, em que as diferenças de concentração de biomassa e substrato são apresentadas em função do tempo, descreve o seu crescimento em quatro fases, como demonstrado na figura 4. Estas fases são classificadas em:

**Fase lag:** Ocorre imediatamente após a inoculação, sendo considerado um período de adaptação das células a um novo ambiente.

**Fase exponencial:** Normalmente apelidada também de fase logarítmica, é nela que a massa e a densidade celular aumentam exponencialmente com o tempo.

**Fase estacionária:** Durante esta fase a taxa de crescimento vai igualar a taxa de morte celular e, portanto, não há aumento da concentração celular devido aos nutrientes do meio serem totalmente consumidos pelos microorganismos.

**Fase de morte:** Nesta última fase, a taxa de morte é superior à taxa de crescimento devido à perda da capacidade de reprodução das células bacterianas.

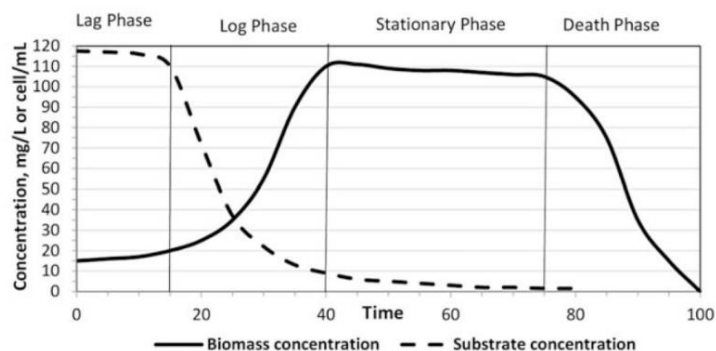


Figura 4. Fases da curva de crescimento bacteriano (retirado de: Goel, 2017)

Consta-se que a termorresistência é mais elevada no início da fase lag, mas assim que as células entram na fase logarítmica diminui acentuadamente. No crescimento de microorganismos termófilos, esta fase é mais curta, assim como a fase exponencial. Alguns termófilos têm sido reportados terem tempos de geração tão curtos quanto 10 min. quando a crescer a elevadas temperaturas.

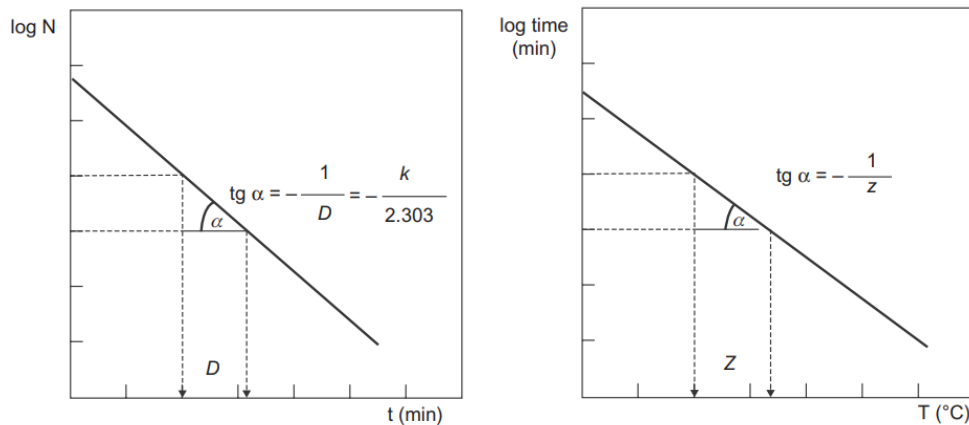
No caso dos esporos, estes germinam e crescem rapidamente. A taxa de morte também é rápida, sendo característico de organismos deste tipo a perda de viabilidade abaixo da gama de crescimento termófilo (Jay, 2005).

## 2.6 Parâmetros de morte térmica- valor de D e Z

Segundo Stumbo (1973), o valor de D (tempo de redução decimal) é o tempo necessário, a qualquer temperatura, para destruir 90% dos esporos ou células vegetativas de um determinado organismo, sendo uma medida da taxa de mortalidade de um organismo. Numericamente, é igual ao número de minutos necessários para a curva de sobrevivência decrescer um ciclo logarítmico.

O valor de z (redução do crescimento) é o número de graus *Celsius* necessários para que a curva de destruição térmica reduza um ciclo logarítmico. Matematicamente, é igual ao inverso do declive da curva de morte térmica (Jay, 2005). A exposição gráfica da obtenção dos valores de D e z apresenta-se na figura 5.

A grande diferença entre o valor de D e z é o facto de o valor D indicar a resistência de um organismo a uma temperatura específica, enquanto que o valor z indica a resistência relativa de um organismo a diferentes temperaturas (Jay, 2005).



**Figura 5.** Demonstração gráfica da obtenção dos valores D e z (retirado de: Deak, 2014).



## 2.6.1 Parâmetros de morte térmica de *Bacillus cereus*

Diversos estudos em que foi avaliada a inativação térmica de *B. cereus* foram realizados em produtos alimentares muito distintos, contudo, nunca haviam sido realizados na matriz desta dissertação (bases vegetais de aveia e muesli). Na tabela 13 encontram-se discriminados os valores da temperatura de referência, temperatura necessária para que o D se reduza à décima parte do seu valor inicial, e os valores de D e de z obtidos em cada um deles.

**Tabela 13.** Exemplo de estudos em que foi avaliada a inativação térmica de *B. cereus* em diversos alimentos.

Referência	Produto alimentar	T <sub>ref</sub> (°C)	D (min.)	Log D (min.)	z (°C)
(Bradshaw et al., 1975)	Sopa enlatada	121.1	0.03	-1.52	9.90
		121.1	2.35	0.37	7.90
(Byrne et al., 2006)	Rolo de carne de porco	85	29.5	1.47	8.60
		90	10.1	1.00	
		95	2.00	0.30	
(Evelyn & Silva, 2015)	Leite com tratamento HPP	70	78.5	1.89	12.5
		80	8.50	0.93	
		90	2.00	0.30	
(Lv et al., 2018)	Vinho de arroz chinês	60	0.56	-0.25	-
		70	0.40	-0.40	
		80	0.31	-0.51	
(Stoeckel et al., 2013)	Fórmula infantil de leite em pó	90	10.9	1.04	13.7
		95	4.41	0.64	
		100	1.83	0.26	
		110	0.34	-0.47	
(Janštová & Lukášová, 2001)	Leite UHT meio gordo	95	2.02	0.31	12.8
		100	0.80	-0.10	
		110	0.13	-0.89	
(S. Xu et al., 2006)	Leite gordo	100	0.35	-0.46	9.50
(Montville et al., 2005)	Leite UHT 2% gordura	80	46.5	1.67	11.7
		90	12.8	1.11	
(Daryaei et al., 2013)	Arroz cozinhado	85	34.6	1.54	74.0
(Novak et al., 2005)	Leite desnatado	72	246.1	2.39	26.9
		78	80.6	1.91	
		100	12.2	1.09	
		130	1.96	0.29	
		150	0.19	-0.72	20.4

## 2.7 Histórico de ensaios desenvolvidos na FRULACT

Ao longo dos últimos anos, diversos estudos têm vindo a ser realizados na FRULACT em contexto de estágios curriculares. Em dois desses estudos recentes, (Sousa, 2017) e (Campos, 2018), foram avaliados os binómios tempo/temperatura de preparados de cereais na inativação do *B. cereus*. Os resultados por eles obtidos encontram-se resumidos na tabela 14.

Apesar dos resultados terem alargado o conhecimento acerca da inativação desta bactéria, há alguns aspetos que ainda não foram estudados, como a testagem de temperaturas mais elevadas (superiores a 95 °C), pH's mais básicos e a aplicação destes em mais tipos de amostras.

**Tabela 14.** Resultados obtidos em estudos anteriormente realizados na FRULACT.

	Valores dos parâmetros avaliados	Binómio tempo/ temperatura	Resultados obtidos			
			Valor de D (min.)			Z (°C)
			85 °C	90 °C	95 °C	
(Sousa, 2017)	Preparado cereais 1 pH=3.9±0.2 A <sub>w</sub> =0.971	40 °C;2h	11.9	3.70	1.83	12.3
		50 °C;2h	7.29	1.63	-	-
		50 °C;4h	4.98	5.55	3.11	48.7
		60 °C;2h	6.89	5.31	1.14	12.8
	Preparado cereais 2 pH4.0±0.2 A <sub>w</sub> =0.983	30 °C;3h	5.30	4.55	3.93	76.9
		40 °C;2h	6.75	5.07	3.36	33.0
		50 °C;2h	6.62	5.62	3.61	38.0
(Campos, 2018)	Preparado 1 pH=5.5±0.2 A <sub>w</sub> >0.95 Brix=12±2	30 °C/3h	11.7	7.50	7.80	58.5
		50 °C/3h	10.1	8.00	7.30	70.4
	Preparado 2 pH=4.0±0.2 A <sub>w</sub> >0.95 Brix=12±2	30 °C/3h	10.2	4.10	2.40	15.8
		50 °C/3h	2.30	2.30	3.80	-
	Preparado 3 pH=5.5±0.2 A <sub>w</sub> ≥0.90 Brix=58±2	30 °C/3h	34.7	19.6	67.6	20.2
		50 °C/3h	6.50	2.80	13.8	13.3
	Preparado 4 pH=4.0±0.2 A <sub>w</sub> ≥0.90 Brix=58±2	30 °C/3h	94.3	75.8	21.7	15.7
		50 °C/3h	10.6	48.8	16.6	10.7

## CAPÍTULO 3- MATERIAIS E MÉTODOS

Todo o trabalho laboratorial foi realizado nas instalações da FRULACT, a produção das amostras e medições de pH na área de desenvolvimento e a preparação e execução das análises microbiológicas no laboratório de microbiologia. Existem, portanto, vários materiais que necessitam ser preparados anteriormente às análises, como é o caso dos meios de cultura e dos meios de pré-enriquecimento.

### 3.1 Preparação do material

Primeiramente, foram preparados tubos de ensaio contendo 9 mL do meio de pré-enriquecimento BPW (*Merck*, Alemanha) para serem utilizados como tubos de diluição sucessivos. Para a suspensão da amostra, também foram preparados frascos *Schott* de 100 mL com 90 mL do meio BPW (*Merck*, Alemanha).

O único meio de cultura necessário para as análises microbiológicas efetuadas foi o *Plate Count Agar* (PCA) (*VWR Chemicals*, Bélgica), que foi preparado de acordo com as instruções do fornecedor em frascos *Schott* de 500 mL com a quantidade de 450 mL. Após todos os frascos *Schott* serem completados com água desionizada até o volume pretendido e esterilizados no autoclave, a 121 °C durante 15 min., o meio foi colocado em placas de Petri para que pudesse ser aplicado o método de espalhamento nas análises.

Todo o material necessita ser esterilizado no autoclave (Panasonic MLS-3781L), aplicando-se um binómio tempo/temperatura de 121 °C por 15 min. Inclusive os frascos *Schott* necessários, de 100 mL e 500 mL, foram esterilizados antes da pesagem das amostras, ainda vazios.

As amostras, bases de aveia (pH= 6,50) e preparado de muesli (pH= 3,60), ficaram armazenadas no frigorífico a aproximadamente 4 °C em embalagens estéreis.

## 3.2 Procedimento experimental

O procedimento experimental é composto por várias etapas, tendo estas de ser cuidadosamente cumpridas para não comprometer as análises microbiológicas. São elas a elaboração dos preparados, a preparação do inóculo, a “ingredientação”, que corresponde à mistura de todos os ingredientes, e a pasteurização.

### 3.2.1 Elaboração dos preparados

As análises microbiológicas foram realizadas em três amostras com características diferentes entre si, como demonstrado na tabela 15.

**Tabela 15.** Características intrínsecas das diferentes amostras analisadas.

Preparado	Características intrínsecas		
	pH	A <sub>w</sub>	Brix
1-Base de aveia LS	6.50	0.98	22*
2-Base de aveia HS	6.50	0.98	25*
3-Preparado de muesli	3.60	~ 0	50

\*Os valores de Brix são idênticos devido às farinhas nelas presentes, e não propriamente devido aos açúcares, a diferença entre *low* e *high sugar*, baseia-se nos valores de glucose e maltose de cada uma delas (base 1: glucose: 130g/L, maltose: 20g/L; base 2: glucose: 5g/L, maltose: 60g/L).

Os preparados foram todos produzidos em marmitas estéreis segundo as formulações e os binómios tempo/temperatura previamente estabelecidos pela FRULACT. Depois de terminados, foram embalados, com recurso a um maçarico, para garrafas estéreis.

Quanto ao armazenamento dos mesmos, foi feito em frigoríficos a  $\pm 4$  °C para não haver o risco de contaminações, visto que poderiam comprometer as análises microbiológicas posteriores.

### 3.2.2 Preparação do inóculo

O inóculo, utilizado para contaminar a amostra, composto pelos esporos de *B. cereus* foi estabelecido após a ressuspensão das células da bactéria. Estas encontravam-se previamente armazenadas em *ependorfs* de 1,5 mL no frio.

O conteúdo desses *ependorfs* foi pipetado para tubos de *Falcon* contendo meio *Brain Heart Infusion* (BHI) que, posteriormente, foram deixados na estufa a 30 °C durante 48h.

Após esse tempo, o meio foi inoculado espalhando-se em *Nutrient Agar* (NA) suplementado com sulfato de manganês e cloreto de cálcio durante 5 dias a 37 °C.

Em seguida, 2-3 mL de água fria esterilizada foram adicionados aos esporos e o líquido resultante foi transferido para *ependorfs* de 1,5 mL após centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min. Foram realizadas várias lavagens entre os ciclos de centrifugação para maximizar a concentração do pellet. A última etapa consistiu em adicionar 1,5 mL de etanol 50% e deixar durante a noite a 4 °C.

No dia seguinte, os *ependorfs* foram centrifugados mais uma vez a 10.000 rpm durante 10 min. e em seguida foi-lhes retirado o sobrenadante e adicionada água esterilizada, tendo sido esta etapa repetida três vezes. Os *ependorfs* finalizados foram armazenados no frigorífico a  $\pm 4$  °C.

### 3.2.3 “Ingredientação”

Foram pesados 550 g (99,8%) da amostra para um frasco *Schott* de 500 ml e adicionado 1 ml (0,2%) do inóculo previamente preparado. Primeiramente, foram aplicados dois binómios de “ingredientação” tempo/temperatura diferentes, 50°C/1h e 60°C/1h, introduzindo os frascos no banho térmico. Estes binómios são efetivamente aplicados durante o processo de produção na fábrica. Para se controlar a temperatura a que a amostra se encontrava colocou-se um termómetro químico, com sensibilidade de 1 °C, num frasco similar (apenas não inoculado).

Após o tempo decorrido, pesou-se 10 g da amostra, sendo esta a amostra considerada como a amostra de “ingredientação”, para um frasco *Schott* contendo 90 mL de BPW. Passados 30 min. iniciou-se a análise microbiológica com a inoculação no PCA.

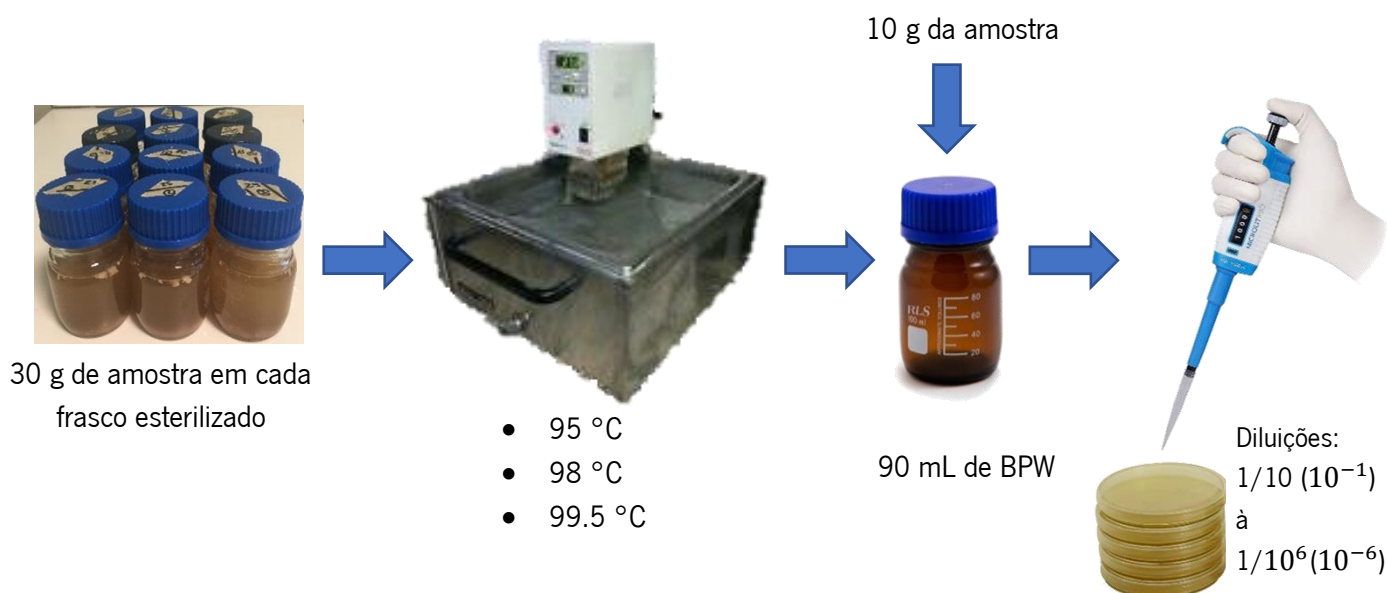


**Figura 6.** Esquema representativo da obtenção da amostra com “ingredientação” 50 °C/1h e 60 °C/1h e sua respetiva análise.

### 3.2.4 Pasteurização

Foram pesados 30 g da amostra resultante da etapa de “ingredientação” para quatro frascos *Schott* estéreis (em triplicado). Em seguida, todos os frascos foram sujeitos a três tratamentos térmicos diferentes, 95°C, 98°C e 99.5 °C durante o tempo estipulado, sendo que este depende da amostra e do binómio aplicado. O frasco de controlo continha a mesma quantidade de amostra, sem o inóculo, e inseriu-se com o termómetro introduzido para se controlar a que temperatura estava efetivamente o conteúdo dos frascos. Ao longo do tempo, os quatro frascos correspondentes aos tempos estabelecidos, por exemplo: t30, t60, t90 e t120, foram sendo retirados e imediatamente colocados num banho de gelo, para causar um choque térmico. Em seguida, depois de arrefecidos, foram pesados 10 g de cada um dos frascos *Schott* para frascos contendo 90 ml de água peptonada (BPW) para enriquecimento.

Foram, portanto, obtidas 12 amostras, no total, que posteriormente foram avaliadas quanto ao seu conteúdo microbiológico, permitindo assim a determinação dos parâmetros de morte térmica de *B. cereus* em diferentes condições de processamento. A cada temperatura, 95°C, 98°C e 99.5°C, o processo foi realizado em triplicado.



**Figura 7.** Esquema representativo do processamento térmico das diferentes amostras em estudo.

### 3.3 Análises microbiológicas

Nas análises microbiológicas realizadas, apenas os esporos de *B. cereus* foram quantificados, de acordo com a norma ISO 21527-1:2008, que, apesar de ser aplicada na quantificação de fungos filamentosos e leveduras viáveis, também pode ser aplicada a esporos bacterianos. Neste caso, o meio de cultura utilizado foi unicamente o *Plate Count Agar* (PCA), sendo um dos mais adequados para o crescimento de *B. cereus*.

#### 3.3.1 Quantificação de esporos bacterianos

Com o auxílio de uma micropipeta, 200 µl da suspensão inicial de cada amostra foram adicionados às placas de Petri previamente plaqueadas com *Plate Count Agar* (PCA). Esta é considerada a primeira diluição e deve ser espalhada na superfície das placas utilizando um espalhador. Em seguida, foram efetuadas diluições sucessivas, retirando 1mL do frasco inicial para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada (BPW) sucessivamente até ao número de diluições pretendidas.

As diluições feitas para o inóculo foram variáveis, dependendo da carga que podiam conter, mas foram realizadas, por exemplo, de  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$ , para o pré-mix de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  e para todas as outras amostras de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ . Este processo foi sempre feito em duplicado. Após as placas estarem todas identificadas, plaqueadas e espalhadas, foram incubadas numa estufa a 30°C durante aproximadamente 72 horas para permitir a contagem de colónias de esporos termorresistentes de *B. cereus* no final do tempo decorrido.

#### 3.3.2 Análise de resultados

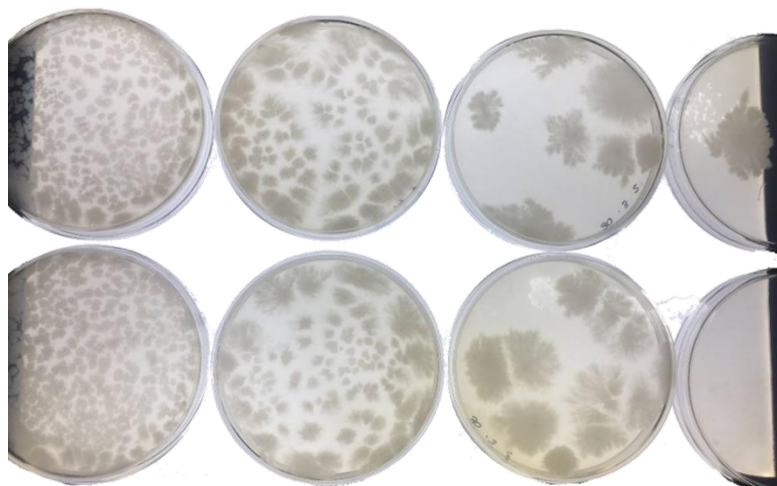
Os valores de UFC's foram quantificados de acordo com a norma ISO 7218:2007 (colónias superiores a 10 e inferiores a 300) (Standardization & Normalisation, 2007). Após a obtenção destes resultados, os valores de UFC's foram sujeitos a um tratamento estatístico para serem validados. Calculou-se a média aritmética dos valores das análises em triplicado, bem como o respetivo desvio padrão. Além disso, para identificar diferenças significativas entre os diferentes binómios aplicados, foi utilizado o suplemento de Análise de Dados do programa Microsoft Office Excel e aplicado o teste Anova de fator único com nível de significância de 0.05. Finalmente, determinaram-se todos os valores de  $R^2$  associados a cada um dos ajustes lineares feitos para calcular os parâmetros cinéticos de morte térmica.

## CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os resultados obtidos durante o trabalho experimental foram sujeitos a tratamento estatístico, sendo que estes se encontram discriminados nos anexos A, B e C.

### 4.1 Avaliação do impacto dos diferentes binómios tempo/temperatura de “ingredientação” e pasteurização na carga microbiana dos preparados

Dois binómios tempo/temperatura (50 °C/1h e 60 °C/1h) foram aplicados em três amostras diferentes, base de aveia *high sugar* (25 °Bx), base de aveia *low sugar* (22 °Bx) e preparado de muesli (50 °Bx), inoculados com 0,2% de *B. cereus* verificando-se, ao fim de uma hora, crescimento microbiano elevado em todos. Devido a este crescimento foi possível realizar o tratamento térmico (pasteurização) e após a sua realização, calcular os valores de morte térmica-valor de D e z.



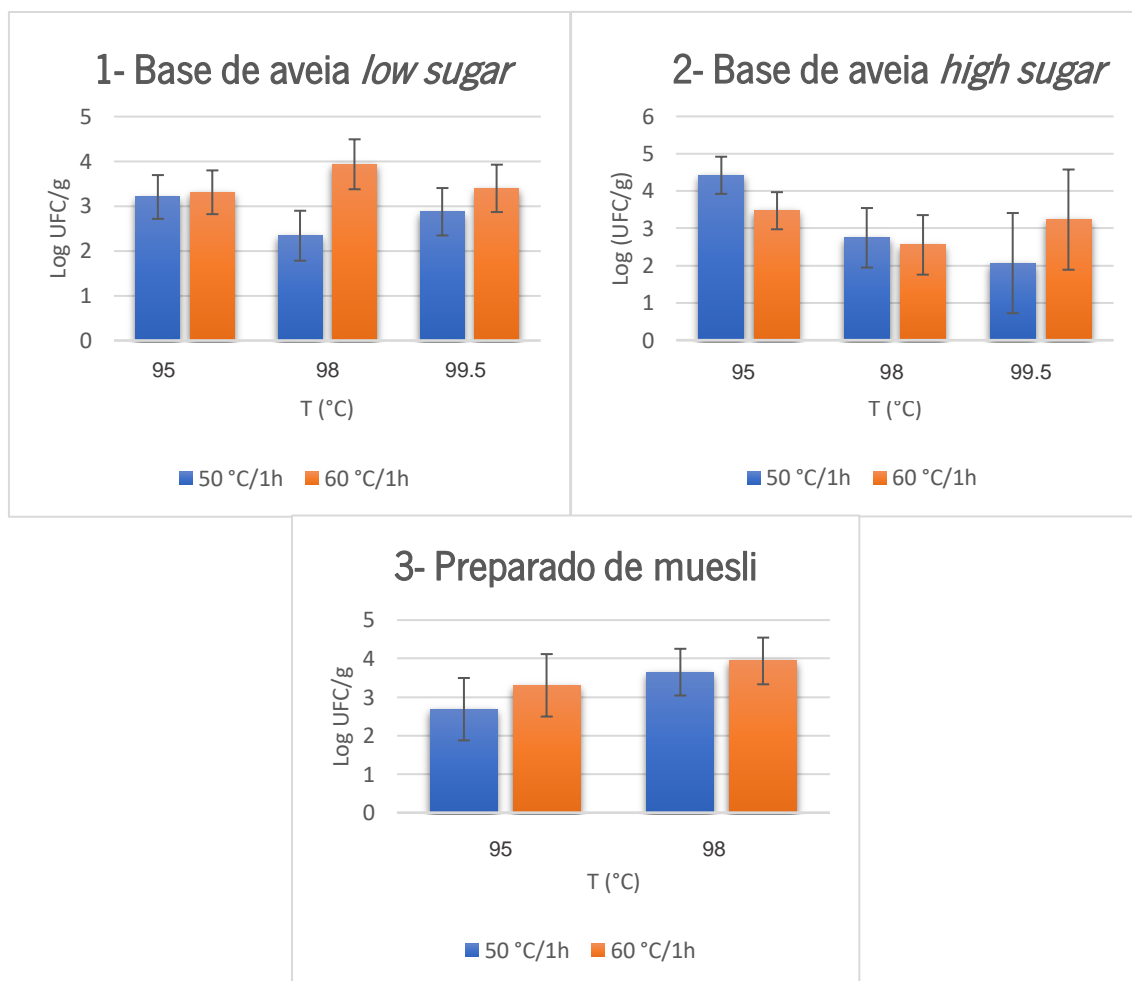
**Figura 8.** Exemplo de placas de quatro diluições diferentes, em duplicado. Imagem real captada durante a contagem de placas.

#### 4.1.1 Efeito da temperatura na termorresistência bacteriana

Depois de quantificado o crescimento bacteriano, a partir da contagem das UFC's para cada binómio tempo/temperatura em função da temperatura nas três amostras, obtiveram-se os resultados ilustrados na figura 9, sendo que se encontram mais detalhados no anexo A.



Estes resultados correspondem à média obtida para cada tempo. Os resultados encontram-se agrupados na figura 9, sendo que não apresentam significância estatística ( $p > 0,05$ ;  $F < F_{\text{crítico}}$ ).



**Figura 9.** Carga bacteriana obtida (valores do logaritmo das UFC's) em cada um dos binómios tempo/temperatura em função da temperatura de pasteurização aplicada.

Analisando a figura 9 podemos afirmar que o *B. cereus* apresenta uma resistência térmica mais elevada quando aplicado o binómio tempo/temperatura de 60 °C/1h, exibindo uma maior carga bacteriana, sendo que esse efeito se verifica em cinco de oito conjugações do binómio com temperaturas de pasteurização diferentes aplicadas. Esta ocorrência pode ser justificada pela elevada resistência que os esporos possuem a condições adversas, como é o caso de temperaturas extremamente elevadas (Markland & Hoover, 2016).

Estes valores demonstram que não existem diferenças significativas entre os diferentes binómios aplicados, não sendo estatisticamente significativos. Isto observou-se em todas as amostras. É de salientar que o método usado para a determinação do número total de bactérias apresenta grande variabilidade, o que pode justificar os desvios observados.

Os tempos de banho térmico foram estabelecidos por tentativa-erro, dado que o inóculo nem sempre apresentava a mesma carga bacteriana e dependendo da temperatura aplicada também os esporos de *B. cereus* se comportavam de formas distintas. Houve alguns tempos testados em que no primeiro tempo de banho térmico já não havia crescimento bacteriano nenhum e por isso diminuíram-se os tempos. Alguns exemplos de morte térmica são: na amostra 1, 60 °C/1h a 98 °C e 50 °C/1h a 99.5 °C aos 30 min., na amostra 2, 50 °C/1h a 98 °C aos 120 min. e na amostra 3, 50 °C/1h a 98 °C aos 10 min. e 50 °C/1h a 99.5 °C aos 4 min. Com isto conclui-se que a temperaturas mais elevadas a inativação da bactéria ocorre muito mais rapidamente.

Nas diferentes temperaturas de pasteurização em que apenas um dos últimos tempos não apresentava um número de colónias superior a 10, de acordo com a norma ISO 7218:2007, foram considerados valores superiores a 4. Isto ocorreu na amostra 1 no binómio 50 °C/1h a 98 °C e no binómio 60 °C/1h a 95 °C, e na amostra 2 no binómio 50 °C/1h a 98 °C e a 99.5 °C.

#### 4.1.2 Determinação dos parâmetros de morte térmica

Recorrendo à norma estatística ISO 7218:2007 (Standardization & Normalisation, 2007) foram calculadas as UFC's a partir das quais conseguimos calcular os parâmetros de morte térmica. Na tabela 16 encontram-se discriminados os valores de D, em min., e os valores de z (°C) para todas as amostras nos diferentes binómios de “ingredientação” estudados.

**Tabela 16.** Valores de D e z de cada binómio de “ingredientação” com o desvio-padrão e média.

Amostras	Binómio de “ingredientação”	Valor de D (min.)			Valor de z (°C)		
		95 °C	98 °C	99.5 °C	z (°C)	DP	Média
1-Aveia <i>low sugar</i>	50 °C/1h	95.24	65.36	31.35	10.03	1.08	10.48
2-Aveia <i>high sugar</i>		69.44	24.21	26.04	9.72		
3-Muesli		13.79	7.46	-	11.25		
1-Aveia <i>low sugar</i>	60 °C/1h	99.01	12.20	5.58	3.56	8.03	12.77
2-Aveia <i>high sugar</i>		70.42	7.90	40.0	18.32		
3-Muesli		6.761	10.30	-	16.42		

Constatou-se que não houve diferenças significativas entre as cargas microbianas associadas aos binómios de “ingredientação” estudados, ou seja, são similares. Na amostra 2, quando aplicado o binómio de “ingredientação” de 60 °C/1h e temperatura de pasteurização de 99.5 °C, o valor de D obtido foi de 40.0 min. Este valor é bastante mais elevado do que os outros

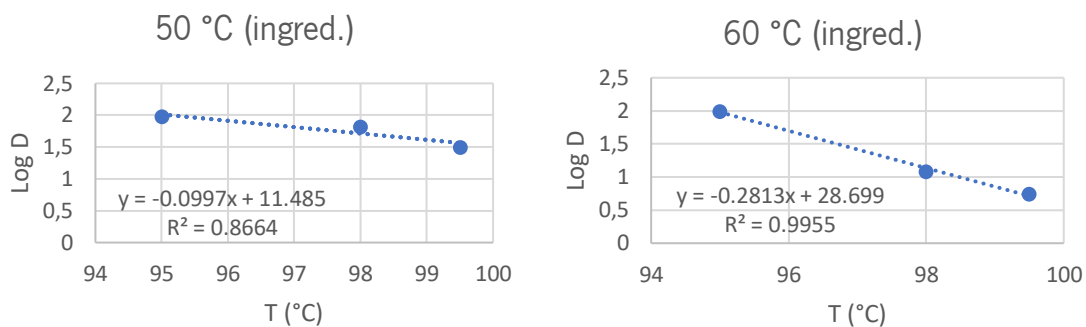
valores de D na mesma temperatura de pasteurização. Este valor pode dever-se à resistência térmica que os esporos de *B. cereus* possuem, demorando mais tempo até ocorrer inativação dos mesmos. E sendo que a amostra 2 corresponde a uma base de aveia com elevada concentração de açúcares, estes podem também conferir um efeito protetor aos microorganismos tornando-os mais termorresistentes.

Para determinar os valores de D das amostras, o logaritmo das UFC's foi avaliado em função do tempo de pasteurização para podermos obter as linhas tendência com a respetiva equação permitindo assim a sua determinação. Depois de realizado os gráficos de dispersão para cada binómio de tempo/temperatura e respetiva temperatura de pasteurização houve uma tendência que se observou em todos eles. Dos quatro pontos de tempo de pasteurização aplicados, o segundo ponto apresentava um grande desvio da linha tendência, sendo que poderá dever-se a algum erro experimental realizado durante o processo. Por esta razão, foi retirado o segundo ponto de todos os gráficos para se obter maior uniformidade de resultados.

Posteriormente, a partir das linhas tendência geradas a partir do logaritmo de D em função das temperaturas de pasteurização, foram gerados os valores de z. Estes valores correspondem também ao inverso negativo do declive das equações das retas. Apesar do uso de um número tão reduzido de pontos para a determinação destes parâmetros, não foi possível a realização de mais ensaios por limitações de tempo geradas pelo contexto de pandemia COVID-19. Portanto, alguns destes resultados servem apenas como uma indicação dos parâmetros de morte térmica possíveis, mas deverão ser futuramente validados utilizando um maior número de dados experimentais. Os resultados representados na tabela 17 e na figura 11 permitem afirmar que o binómio de “ingredientação” e o binómio de pasteurização mais eficazes para inativar os esporos de *B. cereus* são o 60 °C/1h e o 99.5 °C/25 min., respetivamente.

**Tabela 17.** Valores dos logaritmos dos valores de D obtidos nas diferentes temperaturas de ingredientação e pasteurização para cálculo dos valores de z da amostra 1.

T (°C)	Log D	
	50 °C (ingred.)	60 °C (ingred.)
95	1.979	1.996
98	1.815	1.086
99.5	1.496	0.746



**Figura 10.** Valores de z determinados para a amostra 1 sujeito a diferentes binómios tempo/temperatura de “ingredientação” e pasteurização. A – 50 °C/1 h; B – 60 °C/1 h.

É possível verificar, a partir dos valores da tabela 16, que os esporos de *B. cereus* apresentam maior crescimento, números mais elevados de D, quando são submetidos a uma temperatura de pasteurização menor, sendo neste caso 95 °C. Este resultado era expectável devido à termorresistência que este microorganismo possui e, como se observa crescimento em todos os binómios tempo/temperatura de “ingredientação” e pasteurização, era de esperar que à temperatura mais baixa houvesse mais crescimento, devendo-se ao facto desta temperatura não ser a mais favorável para a sua eliminação.

Observou-se também que, em todas as amostras, na generalidade dos binómios, o valor de D vai diminuindo à medida que se aumenta a temperatura de pasteurização. De acordo com a literatura, estes efeitos eram esperados. No entanto, existem algumas exceções a esta ocorrência, sendo a mais evidente na amostra 2, no binómio de “ingredientação” de 60 °C/1h e pasteurização 99.5 °C/80 min, cujo valor de D corresponde a 40 min. quando o valor de D registado do mesmo binómio de “ingredientação” mas a uma temperatura inferior, 98 °C, foi de apenas 7.899.

Na amostra 1, observou-se que os valores de D no binómio de “ingredientação” mais baixo, ou seja, 50 °C/1h, são sempre superiores aos valores de D do binómio com temperatura superior, 60 °C/1h. Isto pode ser explicado pelo facto de, como já foi dito, os esporos adquirirem resistência e necessitarem de um intervalo de temperatura mais elevado para alterar num ciclo logarítmico o valor de D. Contudo, este fenómeno já não é observado nas restantes amostras. Na amostra 2, isto apenas acontece no binómio de pasteurização 98 °C/25 min e na amostra 3, no binómio de pasteurização 95 °C/25 min. A elevada carga microbiana associada a estes binómios de “ingredientação” poderão explicar a ocorrência deste acontecimento, sendo necessário aplicar um valor de z mais elevado no binómio de “ingredientação” de 50 °C/1h para que seja possível atingir maior grau de inativação dos esporos de *B. cereus*.

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

O impacto que os fatores intrínsecos, o pH, a  $a_w$  e a concentração de açúcares, causam na termorresistência do *B. cereus* nas três amostras estudadas foram agrupados para possibilitar a sua comparação.

A avaliação foi efetuada a partir dos valores de D no binómio de pasteurização de 98 °C, assim como os valores de z correspondentes, para ambos os binómios tempo/temperatura de “ingredientação”. Este binómio de pasteurização foi selecionado para ser estudado, por ser o binómio que apresentou valores mais concordantes com o expectável da literatura e carga microbiana em todos os pontos.

### 4.2.1 Efeito do pH

Foram agrupados os resultados de todas as amostras com o objetivo de se avaliar o efeito do pH na inativação do *B. cereus*, sendo que as amostras 1 e 2 possuem o mesmo valor, pH=6.5 (menos ácido) e a amostra 3 pH=3.6 (mais ácido).

Como já foi descrito anteriormente, é expectável que em ambientes com valores de pH mais baixos haja redução da resistência térmica dos esporos, ou seja, são inativados mais facilmente (Leguerinel & Mafart, 2001). Assim sendo, a amostra 3 que possuía um valor de pH mais ácido em comparação com o valor das amostras 1 e 2, não deveria necessitar de temperaturas muito elevadas para eliminar os esporos, tendo em conta a sua elevada termorresistência.

O *B. cereus*, é uma bactéria que se desenvolve melhor em ambientes cujo pH mínimo é de 4.9, o pH ótimo está situado entre 6.0 e 7.0 e o pH máximo é de 8.8. Os esporos são capazes de resistir a valores de pH ainda mais baixos, como por exemplo do ácido gástrico (entre 1 e 5.2) (Clavel et al., 2004). Portanto, o expectável era haver maior crescimento microbiano nas amostras 1 e 2, dado que o pH da amostra 3 (pH=3.6) se encontrava fora da gama de pH's ótimos de desenvolvimento desta bactéria.

Na tabela 17 encontram-se os valores de D e z de cada amostra do binómio de pasteurização selecionado.

**Tabela 18.** Valores de D e z obtidos a partir do binómio de pasteurização a 98 °C para cada amostra estudada.

	Binómio de “ingredientação”	Valor de D (min.)	z (°C)
		98 °C	
1-Base de aveia <i>high</i> <i>sugar</i>	50 °C/1h	65.36	10.03
	60 °C/1h	12.20	3.555
2-Base de aveia <i>low</i> <i>sugar</i>	50 °C/1h	24.21	9.718
	60 °C/1h	7.899	18.32
3-Preparado de muesli	50 °C/1h	7.463	11.25
	60 °C/1h	10.30	16.42

Analisando a tabela 17 constata-se que a amostra 3, que possui um pH mais ácido (3.6), necessita de temperaturas elevadas para eliminar os esporos em ambos os binómios tempo/temperatura, sendo um pouco invulgar isto acontecer visto que valores de pH mais baixos reduzem a resistência térmica dos esporos. Em contrapartida, os valores de D são bastante baixos, significando isto que apesar de serem necessárias temperaturas mais elevadas para inativar os esporos, estes começam a ser inativados em poucos minutos.

É possível também afirmar que, pela observação dos valores de D, na amostra 1, no binómio de “ingredientação” 50 °C/1h, apesar da temperatura necessária para eliminar os esporos ser baixa (10.03 °C), é necessário um tempo muito superior a todos os outros observados para as outras amostras (65.36 min.), para conseguir diminuir a população bacteriana em 90%. Em contrapartida, a amostra 2 demonstra o valor de z mais elevado (18.32 °C) no binómio de “ingredientação” 60 °C/1h, sendo que o valor de D é dos mais baixos (7.90 min.). No geral, estas 2 amostras apresentam valores mais elevados de D devido ao valor do seu pH se encontrar acima dos valores normalmente observados de crescimento de esporos de *B. cereus*.

#### 4.2.2 Efeito da atividade da água

Com o objetivo de avaliação do efeito da  $a_w$  na inativação de *B. cereus* foram comparadas amostras com  $a_w$  diferentes. As amostras 1 e 2 apresentam valores de  $a_w=0.98$  enquanto que a amostra 3 apresenta um valor de  $a_w$  muito baixo (quase 0).

De acordo com a literatura, o aumento da  $a_w$  induz um efeito protetor aos microorganismos, tornando-os mais termorresistentes. Ou seja, a diminuição da  $a_w$ , que pode ocorrer em diversos métodos como a adição de sal ou açúcar e a secagem, resulta na inibição do crescimento microbiano.

No caso destas 3 amostras, era de esperar um crescimento microbiano mais visível nas amostras 1 e 2, tendo em conta os valores de  $a_w$  elevados, necessitando de temperaturas mais baixas para inibição do crescimento de *B. cereus*. Em contrapartida, a amostra 3 possui um valor muito reduzido de  $a_w$ , prevendo-se um crescimento microbiano mais reduzido, sendo que a água disponível não é suficiente para o desenvolvimento desta bactéria. Para além disso, a gama de  $a_w$  em que *B. cereus* se desenvolve é entre 0.93 e 0.99, sendo as amostras 1 e 2 mais propícias a este desenvolvimento.

Analisando a tabela 17, verifica-se que, em metade dos valores, tanto para a amostra 1 como para a 2, é necessário um intervalo de temperatura (valor de z) superior para eliminar os esporos de *B. cereus* no caso da amostra 1 no binómio de “ingredientação” de 50 °C/1h e, no caso da amostra 2 no binómio de “ingredientação” de 60 °C/1h, quando em comparação com a amostra 3. Como a amostra 1 e 2 possuíam mais água disponível, e os seus valores de  $a_w$  se encontram inseridos na gama de crescimento de *B. cereus*, estes resultados eram expectáveis, apesar de não seguirem todos este padrão.

A amostra 3 necessita, portanto, de temperaturas mais baixas para eliminar os esporos, sendo os tempos necessários para diminuir a população a 90% (valores de D) também menores quando comparados com os valores das amostras 1 e 2.

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

Ao analisar todos os pontos que foram discutidos anteriormente, podemos concluir quais serão as condições ideais para a inativação de esporos de *B. cereus*. Para a definição dessas condições tem que se ter também em consideração a preservação das características organolépticas das amostras, para que a qualidade alimentar também seja preservada. Com a utilização de temperaturas mais baixas, vão ocorrer menos alterações nas amostras, logo o binómio tempo/temperatura de “ingredientação” que seria mais vantajoso aplicar, à partida, seria 50 °C/1h. No entanto, os valores de termorresistência apresentaram-se equilibrados quando comparados com o binómio 60 °C/1h, não sendo sempre superiores os do binómio 50 °C/1h, que seria o esperado.

O estudo feito por Sutherland & Limond (1993) indica que níveis elevados de açúcares, que correspondem a valores inferiores de  $a_w$ , assim como valores de pH baixos são capazes de controlar a produção da toxina diarreica de *B. cereus*. Ora se analisarmos todas as amostras utilizadas neste estudo, a amostra 3 seria aquela que encaixaria melhor neste perfil, pois possui um nível elevado de açúcar,  $a_w$  baixa e pH baixo. Apesar disto, depois de analisados os valores obtidos, foi a amostra 3 que apresentou os resultados mais favoráveis, nomeadamente valores de D mais baixos, demorando bastante menos tempo a inativar os esporos, e apresentou temperaturas de morte térmica (valores de z) razoáveis também, embora não sendo as mais baixas de todas as amostras.

Relativamente à amostra 1, esta mostra-se como sendo aquela que oferece as melhores condições à resistência de *B. cereus*, devido a possuir condições ótimas de crescimento. PH= 6.5, ou seja, dentro da gama ótima de crescimento da bactéria e  $a_w = 0.98$ , possuindo bastante água livre que possibilita o desenvolvimento de microorganismos. Os valores de z não são muito altos em ambos os binómios de “ingredientação” apesar de apresentar valores de D elevados. Já a amostra 2, embora precise de um intervalo de temperatura moderadamente baixo, requer também mais tempo para reduzir a população em 90% (valor de D).



## CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos nesta dissertação, pode-se afirmar que os objetivos propostos foram cumpridos. Foi avaliado o comportamento dos esporos da bactéria *B. cereus* em três amostras possuindo características diferentes de pH,  $a_w$  e concentração de açúcares quando expostas a binómios tempo/temperatura de “ingredientação” e pasteurização. Os parâmetros de morte térmica, valores de D e z, foram calculados para cada condição tendo sido depois estudados e comparados entre si.

De acordo com o descrito na literatura, valores elevados de  $a_w$  e de pH potenciam o crescimento microbiano, sendo que se pode afirmar que as amostras 1 e 2 são mais termorresistentes devido a possuírem valores de  $a_w$  mais elevados (0.98). Assim, estas amostras apresentam valores de z mais elevados no binómio de “ingredientação” 50 °C/1h (amostra 1) e no binómio 60 °C/1h (amostra 2).

Para a amostra 1 (pH= 6.5;  $a_w$ = 0.98; 22 °Bx) obteve-se  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 65.36 min.; z= 10.03 °C quando aplicado o binómio de tempo/temperatura de “ingredientação” de 50 °C/1h e  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 12.20 min.; z= 3.555 °C quando aplicado o binómio de tempo/temperatura de “ingredientação” de 60 °C/1h. Na amostra 2, que possui características muito semelhantes (pH= 6.5;  $a_w$ = 0.98; 25 °Bx) obteve-se  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 24.21 min.; z= 9.718 °C quando aplicado o binómio de tempo/temperatura de “ingredientação” de 50 °C/1h e  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 7.899 min.; z= 18.32 °C quando aplicado o binómio de tempo/temperatura de “ingredientação” de 60 °C/1h. Já na amostra 3, que possui um pH mais ácido (pH= 3.6) e por isso menos favorável ao crescimento dos esporos de *B. cereus* obteve-se  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 7.463 min.; z= 11.25 °C quando aplicado o binómio de tempo/temperatura de “ingredientação” de 50 °C/1h e  $D_{98^\circ\text{C}}$ = 10.30 min.; z= 16.42 °C.

Relativamente aos valores de z, as condições da amostra 1 seriam, *a priori*, as ideais à inativação do *B. cereus* uma vez que se trata da amostra que apresenta os valores de z mais baixos. No entanto, analisando os valores de D pode-se concluir que são muito elevados e que a amostra 3 foi a que apresentou melhores valores.

Pode-se afirmar também que este estudo serviu para validar os resultados de ensaios anteriormente realizados na FRULACT. Tal como foi observado em cada um deles, o *B. cereus* demonstrou ser mais termorresistente quando lhe foi aplicado um binómio tempo/temperatura de “ingredientação” de 50 °C/1h.

Futuramente, poderiam ser realizadas análises organoléticas às amostras, no fim do processamento térmico, com o intuito de se avaliar o comprometimento das características

organolélicas. Também poderia ser vantajosa a realização da avaliação da termorresistência de *B. cereus* mas, neste caso, para comparação de amostras contendo outros fatores intrínsecos diferentes, como o potencial de oxidação-redução e outros componentes químicos dos alimentos como as vitaminas e os sais minerais.

Também poderia ser benéfico, para aumentar a robustez dos resultados, aumentar o tipo de amostras a utilizar, testando mais tipos de cereais diferentes e menos explorados como a quinoa e a espelta. O número de ensaios por amostra também poderia ser aumentado para, pelo menos, quatro ou cinco por temperatura, para haver maior termo de comparação entre eles. Para a determinação dos esporos, também se poderiam testar diferentes métodos como métodos moleculares baseados no PCR (reação em cadeia da polimerase), sendo exemplos destes o *Nested* PCR e o *Randomly Amplified Polymorphic DNA* PCR (RAPD PCR) ou a partir de biossensores como os biossensores *DNA-based*, sendo que o objetivo seria de se avaliar a sua eficácia comparativamente ao método utilizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, Martin R. & Moss, M. O. (2008). *Adams and Moss - Food Microbiology - 2007*, 3rd Edition. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Adams, M. R. (2014). Acids and Fermentation. *Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry*, 467–479. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381504-0.00019-6>
- António Sérgio Alves Rebelo. (2014). *Efeito das Altas Pressões nas características nutricionais, sensoriais e microbiológicas de um produto de salsicharia*. (Dissertação de mestrado, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal).
- ASAE. (2017). *HACCP - o que é*. Consultado a 10 de Dezembro de 2020 em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/haccp>.
- Baird-Parker, A. C., Boothroyd, M., & Jones, E. (1970). The Effect of Water Activity on the Heat Resistance of Heat Sensitive and Heat Resistant Strains of Salmonellae. *Journal of Applied Bacteriology*, 33(3), 515–522. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1970.tb02228.x>
- Ball, D. W. (2006). Concentration scales for sugar solutions. *Journal of Chemical Education*, 83(10), 1489–1491. <https://doi.org/10.1021/ed083p1489>
- Baptista, P., & Venâncio, A. (2003). Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. In *Os Perigos para a Segurança Alimentar no Processamento de Alimentos* (Vol. 4).
- Barbosa-Cánovas, G. V., Anthony J. Fontana, J., Schmidt, S. J., & Labuza, T. P. (2007). *Water activity in foods*.
- Barbosa, G. V., Davidson, P. M., Dreher, M., Hartel, R. W., Juneja, L. R., Karel, M., ... Yada, R. Y. (2007). Handbook of Food Preservation. In M. S. Rahman (Ed.), *Aktuelle Gerontologie* (Second, Vol. 6).
- Bento, A. (2020). Segurança alimentar: uma responsabilidade partilhada. Consultado a 7 de Setembro de 2021 em: <https://www.publico.pt/2020/06/07/opiniao/opiniao/seguranca-alimentar-responsabilidade-partilhada-1919546>
- Beuchat, L. R., Komitopoulou, E., Beckers, H., Betts, R. P., Bourdichon, F., Fanning, S., ... Kuile, B. H. T. (2013). Low-water activity foods: Increased concern as vehicles of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 76(1), 150–172. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-211>
- Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382–398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>
- Bradshaw, J. G., Peeler, J. T., & Twedt, R. M. (1975). Heat resistance of ileal loop reactive *Bacillus cereus* strains isolated from commercially canned food. *Applied Microbiology*, 30(6), 943–945. <https://doi.org/10.1128/am.30.6.943-945.1975>
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and P. W. (2003). *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 4; Garland Science, Ed.).
- Byrne, B., Dunne, G., & Bolton, D. J. (2006). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiology*, 23(8), 803–808. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.02.002>
- Callegan, M. C., Kane, S. T., Cochran, D. C., & Gilmore, M. S. (2002). Molecular mechanisms of *Bacillus endophthalmitis* pathogenesis. *DNA and Cell Biology*, 21(5), 367–373. <https://doi.org/10.1089/10445490260099647>

- Campos, A. P. C. (2018). *Avaliação da termorresistência de Bacillus cereus em preparados de cereais com base na variação da temperatura , pH e atividade da água*. (Dissertação de mestrado, Universidade do Minho, Portugal).
- Center for Disease Control. (2004). FoodNet Surveillance Report for 2004 (Final Report). *FoodNet Surveillance Report, 2006*(June), 203.
- Chien, A. C., Hill, N. S., & Levin, P. A. (2012). Cell size control in bacteria. *Current Biology, 22*(9), R340–R349. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.032>
- Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., & Schmitt, P. (2004). Survival of Bacillus cereus spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology, 97*(1), 214–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02292.x>
- Coroller, L., Leguérinel, I., & Mafart, P. (2001). Effect of water activities of heating and recovery media on apparent heat resistance of Bacillus cereus spores. *Applied and Environmental Microbiology, 67*(1), 317–322. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.317-322.2001>
- Coton, E., & Leguerinel, I. (2014). Ecology of Bacteria and Fungi in Foods: Effects of pH. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition, 1*, 577–586. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00439-0>
- CRFSFS. (2003). Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods - Full Report. *Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods, 2*(223), 1–109. Retrieved from <http://www.fda.gov/>
- Custer, C. S. (2014). History of Food Microbiology (A Brief). In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (Second Edi, Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00165-8>
- Daryaei, H., Balasubramaniam, V. M., & Legan, J. D. (2013). Kinetics of bacillus cereus spore inactivation in cooked rice by combined pressure-heat treatment. *Journal of Food Protection, 76*(4), 616–623. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-447>
- David Rifkind, G. L. F. (2005). Introduction to Part C: BACTERIA. *The Bulletin of the National Association of Secondary School Principals, 26*(109), 85–91. <https://doi.org/10.1177/019263654202610910>
- Deak, T. (2014). Thermal Treatment. *Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry, 423–442*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381504-0.00017-2>
- Dechemi, S., Benjelloun, H., & Lebeault, J. M. (2005). Effect of modified atmospheres on the growth and extracellular enzyme activities of psychotrophs in raw milk. *Engineering in Life Sciences, 5*(4), 350–356. <https://doi.org/10.1002/elsc.200520082>
- Evelyn, & Silva, F. V. M. (2015). High pressure processing of milk: Modeling the inactivation of psychrotrophic Bacillus cereus spores at 38-70 °c. *Journal of Food Engineering, 165*, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.017>
- Food, E., Authority, S., & Centre, E. (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal, 12*(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3547>
- Gaillard, S., Leguerinel, I., & Mafart, P. (1998). Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of Bacillus cereus spores. *Journal of Food Science, 63*(5), 887–889. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb17920.x>
- Gibbert, J. (1979). *Toxins of Characteristics*. (February), 219–228.
- Goel, S. (2017). Advances in solid and hazardous waste management. *Advances in Solid and*

- Hazardous Waste Management*, 1–371. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-57076-1>
- González-Fandos, E., & Dominguez, J. L. (2007). Effect of potassium sorbate washing on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. *Food Control*, *18*(7), 842–846. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.04.008>
- Granum, P. E. (1994). *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology*, *76*, 61S-66S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04358.x>
- Húngaro, H. M., Peña, W. E. L., Silva, N. B. M., Carvalho, R. V., Alvarenga, V. O., & Sant'Ana, A. S. (2014). Food Microbiology. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, *3*, 213–231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00059-0>
- Jackson, L. S. (2009). Chemical Food Safety Issues in the United States: Past, Present, and Future. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(18), 8161–8170. <https://doi.org/10.1021/jf900628u>
- Janštová, B., & Lukášová, J. (2001). Heat resistance of bacillus spp. spores isolated from cow's milk and farm environment. *Acta Veterinaria Brno*, *70*(2), 179–184. <https://doi.org/10.2754/avb200170020179>
- Jay, J. M. (2005). Modern Food Microbiology. *Modern Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-6480-1>
- Joye, I. J. (2018). Acids and bases in food. In *Encyclopedia of Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21582-5>
- Leguerinel, I., & Mafart, P. (2001). Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, *63*(1–2), 29–34. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00394-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00394-9)
- Lodé, T. (2012). Have sex or not? Lessons from bacteria. *Sexual Development*, *6*(6), 325–328. <https://doi.org/10.1159/000342879>
- Lopez, M. E. S., Gontijo, M. T. P., Boggione, D. M. G., Albino, L. A. A., Batalha, L. S., & Mendonça, R. C. S. (2018). Microbiological Contamination in Foods and Beverages: Consequences and Alternatives in the Era of Microbial Resistance. In *Microbial Contamination and Food Degradation*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811515-2.00003-2>
- Lv, R., Chantapakul, T., Zou, M., Li, M., Zhou, J., Ding, T., ... Liu, D. (2018). Thermal inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in Chinese rice wine and in simulated media based on wine components. *Food Control*, *89*, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.029>
- Markland, S. M., & Hoover, D. G. (2016). *Bacillus cereus* Mechanisms of Resistance to Food Processing. In *The Diverse Faces of Bacillus cereus*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801474-5.00004-9>
- Mazas, M., Martínez, S., López, M., Alvarez, A. B., & Martín, R. (1999). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores affected by the solutes used to control water activity of the heating medium. *International Journal of Food Microbiology*, *53*(1), 61–67. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00145-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00145-2)
- Montville, T. J., Dengrove, R., De Siano, T., Bonnet, M., & Schaffner, D. W. (2005). Thermal resistance of spores from virulent strains of *Bacillus anthracis* and potential surrogates. *Journal of Food Protection*, *68*(11), 2362–2366. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.11.2362>
- Morya, S., Amoah, A. E. D. D., & Snaebjornsson, S. O. (2020). Food poisoning hazards and their

- consequences over food safety. In *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819001-2.00019-x>
- Motarjemi, Y. (2016). The Starting Point: What Is Food Hygiene? In *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00001-7>
- Novak, J. S., Call, J., Tomasula, P., & Luchansky, J. B. (2005). An assessment of pasteurization treatment of water, media, and milk with respect to *Bacillus* spores. *Journal of Food Protection*, *68*(4), 751–757. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.4.751>
- OMS. (2020). Food Safety. Consultado em 10 de Dezembro de 2020 em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Paul, C., Filippidou, S., Jamil, I., Kooli, W., House, G. L., Estoppey, A., ... Junier, P. (2019). Bacterial spores, from ecology to biotechnology. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 106). <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.10.002>
- Pinto, H. A., & Pereira, M. (2016). *Avaliação da termorresistência de microrganismos formadores de esporos em preparados FRULACT*. Retrieved from <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/46668%0Ahttp://repositorium.sdum.uminho.pt/>
- Prévost, H., & Brillet-Viel, A. (2014). Ecology of Bacteria and Fungi in Foods: Influence of Redox Potential. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, *1*, 595–601. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00088-4>
- Raven, P.H. and Johnson, G. B. (2002). *Biology* (6th ed.; McGraw-Hill Education- Europe, Ed.).
- Ross, T., & Nichols, D. S. (2014). Ecology of Bacteria and Fungi in Foods: Influence of Available Water. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (Second Edi, Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00086-0>
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R., & Devlieghere, F. (2011). Validated empirical models describing the combined effect of water activity and pH on the heat resistance of spores of a psychrotolerant *Bacillus cereus* strain in broth and Béchamel sauce. *Journal of Food Protection*, *74*(10), 1662–1669. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-041>
- Scott, W. J. (1957). Water Relations of Food Spoilage Microorganisms. *Advances in Food Research*, *7*(C), 83–127. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60247-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60247-5)
- Setlow, P., & Johnson, E. A. (2014). Spores and Their Significance. In *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch3>
- Standardization, F. O. R., & Normalisation, D. E. (2007). *International Standard ISO. 2007*.
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(4), 579–606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
- Stoeckel, M., Westermann, A. C., Atamer, Z., & Hinrichs, J. (2013). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores in infant formula under shear conditions. *Dairy Science and Technology*, *93*(2), 163–175. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0101-6>
- Stumbo, C. R. (1973). Important Terms and Equations. *Thermobacteriology in Food Processing*, 123–128. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-675352-3.50017-6>
- Sutherland, A. D., & Limond, A. M. (1993). Influence of pH and Sugars on the Growth and Production of Diarrhoeagenic Toxin by *Bacillus Cereus*. *Journal of Dairy Research*, *60*(4), 575–580. <https://doi.org/10.1017/S0022029900027928>

- Syamaladevi, R. M., Tang, J., Villa-Rojas, R., Sablani, S., Carter, B., & Campbell, G. (2016). Influence of Water Activity on Thermal Resistance of Microorganisms in Low-Moisture Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 353–370. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12190>
- TORREZAN, R., JARDINE, J. G., & VITALI, A. de A. (1999). Efeito da adição de solutos e ácidos em poupa de goiaba. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19(1), 43–45. <https://doi.org/10.1590/s0101-20611999000100011>
- Warren, S. C., & Gould, G. W. (2006). Bacillus cereus spore germination: Absolute requirement for an amino acid. In *BBA - General Subjects* (Vol. 170). [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(68\)90014-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(68)90014-7)
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>
- Xu, S., Labuza, T. P., & Diez-Gonzalez, F. (2006). Thermal inactivation of Bacillus anthracis spores in cow's milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4479–4483. <https://doi.org/10.1128/AEM.00096-06>
- Yilmaz, N., Houbraken, J., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., Visagie, C. M., & Samson, R. A. (2012). *and Related Species*. 6(4), 39–54.

## ANEXOS

### ANEXO A

#### **Carga microbiana associada aos binómios de “ingredientação”**

Os dados que podemos encontrar neste anexo correspondem aos cálculos intermédios realizados de acordo com os limites de deteção da técnica imposta pela norma ISO 7218:2007, isto é, só foram considerados os números de colónias entre 10 e 300. Em seguida, foram calculadas o número de unidades formadoras de colónias de acordo com cada uma das diluições onde estas se encontravam. Posteriormente, calculou-se o logaritmo de cada um dos valores e obtiveram-se os valores apresentados em seguida.

Por fim, foi calculada a média e o desvio-padrão do logaritmo das unidades formadoras de colónias, com o objetivo de se conseguir quantificar a carga microbiana associada a cada um dos binómios de “ingredientação”.



**Tabela 19- A1.** Média do logaritmo de UFC/g associada aos binômios de “ingredientação”, ao longo dos binômios de pasteurização correspondentes à amostra 1, acompanhada do desvio-padrão respectivo.

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min.)	Log UFC/g						
		50 °C/1h	Média	Desvio-padrão	60 °C/1h	Tempo de pasteurização (min.)	Média	Desvio-padrão
95 (1)	30	5.40	4.168	0.816	2.69	30	2.465	0.570
	60	4.23			3.17	60		
	90	3.13			2.40	90		
	120	3.91			1.60	120		
95 (2)	30	3.22	3.355	0.968	3.59	30	3.218	1.087
	60	4.92			4.83	60		
	90	3.00			2.13	90		
	120	2.28			2.32	120		
95 (3)	30	2.31	2.103	0.177	4.29	30	4.248	0.264
	60	2.08			4.28	60		
	90	1.83			4.58	90		
	120	2.19			3.84	120		
95 (média)	30	3.64	3.208	0.489	3.52	30	3.310	0.561
	60	3.74			4.09	60		
	90	2.65			3.04	90		
	120	2.79			2.59	120		
98 (1)	30	2.00	1.945	0.145	4.11	10	3.975	0.262
	60	2.00			4.06	15		
	90	2.08			4.20	20		
	120	1.70			3.53	25		
98 (2)	30	4.75	2.655	1.230	4.68	10	4.375	1.367
	60	2.19			4.03	15		
	90	2.08			2.49	20		
	120	1,60			6.30	25		
98 (3)	30	3.00	2.428	0.382	3.12	10	3.455	1.074
	60	2.18			2.65	15		
	90	2.00			2.76	20		
	120	2.53			5.29	25		
98 (média)	30	3.25	2.343	0.528	3.97	10	3.935	0.701
	60	2.12			3.58	15		
	90	2.05			3.15	20		
	120	1.94			5.04	25		
99.5 (1)	10	4.19	3.335	0.575	7.33	10	4.083	1.890
	15	3.52			3.39	15		
	20	2.72			2.81	20		
	25	2.91			2.80	25		
99.5 (2)	10	2.75	3.025	0.606	5.53	10	3.670	1.099
	15	4.07			3.33	15		
	20	2.58			3.13	20		
	25	2.70			2.69	25		

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min.)	50 °C/1h	Média	Desvio-padrão	60 °C/1h	Tempo de pasteurização (min.)	Média	Desvio-padrão
99.5 (3)	10	2.17	2.260	0.112	2.77	10	2.443	0.247
	15	2.45			2.14	15		
	20	2.19			2.28	20		
	25	2.23			2.58	25		
99.5 (média)	10	3.04	2.873	0.339	5.21	10	3.398	1.051
	15	3.35			2.95	15		
	20	2.50			2.74	20		
	25	2.61			2.69	25		

**Tabela 20- A2.** Média do logaritmo de UFC/g associada aos binômios de “ingredientação”, ao longo dos binômios de pasteurização correspondentes à amostra 2, acompanhada do desvio-padrão respectivo.

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min.)	Log UFC/g						
		50 °C/1h	Média	Desvio-padrão	Tempo de pasteurização (min.)	60 °C/1h	Média	Desvio-padrão
95 (1)	30	4.54	4.178	0.233	30	4.12	3.305	0.787
	60	3.94			60	4.00		
	90	4.22			90	2.86		
	120	4.01			120	2.24		
95 (2)	30	4.76	4.320	0.883	30	4.13	3.897	0.410
	60	4.23			60	4.24		
	90	5.34			90	3.32		
	120	2.95			120			
95 (2)	30	5.42	4.345	1.290	30	5.34	3.583	1.051
	60	2.78			60	3.37		
	90	5.80			90	3.02		
	120	3.38			120	2.60		
95 (média)	30	4.91	4.281	0.740	30	4.53	3.472	0.798
	60	3.65			60	3.87		
	90	5.12			90	3.07		
	120	3.45			120	2.42		
98 (1)	30	4.70	2.475	1.684	30	2.92	2.503	0.344
	60	2.94			60	2.75		
	90	2.26			90	2.26		
	120	0			120	2.08		
98 (2)	30	6.67	3.133	2.054	30	3.13	1.835	1.142
	60	2.10			60	2.21		
	90	2.16			90	2.00		
	120	1.60			120	0		

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min.)	50 °C/1h			60 °C/1h			
		Média	Desvio-padrão	Tempo de pasteurização (min.)	Média	Desvio-padrão		
98 (3)	30	3.33	2.630	0.465	30	4,06	3.330	0.743
	60	2.68			60	3,94		
	90	2.47			90	3,11		
	120	2.04			120	2,21		
98 (médio)	30	4.90	2.746	1.344	30	3.37	2.556	0.726
	60	2.57			60	2.97		
	90	2.30			90	2.46		
	120	1.21			120	1.43		
99.5 (1)	20	3.10	2.045	1.209	20	3.84	2.963	0.665
	40	2.72			40	3.23		
	60	2.36			60	2.76		
	80	0			80	2.02		
99.5 (2)	20	3.22	2.478	0.435	20	4.10	3.250	0.578
	40	2.26			40	3.41		
	60	2.32			60	2.94		
	80	2.11			80	2.55		
99.5 (3)	20	2.63	1,6775	0.998	20	4.22	3.488	0.473
	40	2.00			40	3.59		
	60	2.08			60	3.07		
	80	0			80	3.07		
99.5 (médio)	20	2.98	2.067	0.837	20	4.05	3.233	0.564
	40	2.33			40	3.41		
	60	2.25			60	2.92		
	80	0.70			80	2.55		

Tabela 21- A3. Média do logaritmo de UFC/g associada aos binômios de “ingredientação”, ao longo dos binômios de pasteurização correspondentes à amostra 3, acompanhada do desvio-padrão respectivo.

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min.)	Log UFC/g						
		50 °C/1h	Média	Desvio-padrão	Tempo de pasteurização (min.)	60 °C/1h	Média	Desvio-padrão
95 (1)	10	4.84	3.348	0.917	10	3.50	3.230	0.252
	15	2.38			15	3.37		
	20	3.26			20	3.20		
	25	2.91			25	2.83		

Banho térmico (°C)	Tempo de pasteurização (min.)	50 °C/1h	Média	Desvio-padrão	Tempo de pasteurização (min.)	60 °C/1h	Média	Desvio-padrão
95 (2)	10	2.76	2.618	0.554	10	5.90	3.568	1.424
	15	2.21			15	3.09		
	20	3.46			20	3.24		
	25	2.04			25	2.04		
95 (3)	10	3.04	2.093	1.295	10	3.45	3.125	0.297
	15	0			15	2.68		
	20	3.29			20	3.33		
	25	2.04			25	3.04		
95 (média)	10	3.55	2.686	0.810	10	4.28	3.306	0.607
	15	1.53			15	3.05		
	20	3.34			20	3.26		
	25	2.33			25	2.64		
98 (1)	4	4.76	4.408	0.311	10	3.94	4.320	2.093
	6	4.33			15	7.80		
	8	4.60			20	3.25		
	10	3.94			25	2.29		
98 (2)	4	4.78	4.018	0.553	10	4.23	3.558	0.501
	6	4.30			15	3.62		
	8	3.41			20	3.56		
	10	3.58			25	2.82		
98 (3)	4	2.86	2.520	0.340	10	3.31	0.828	1.433
	6	2.18			15	0		
	8	2.86			20	0		
	10	2.18			25	0		
98 (média)	4	4.13	3.648	0.320	10	4.09	3.939	1.157
	6	3.60			15	5.71		
	8	3.62			20	3.41		
	10	3.23			25	2.56		

## ANEXO B

### Valores do Teste *Anova* fator único

A análise estatística que se encontra nas Tabelas B1, B2 e B3 diz respeito aos resultados estatísticos obtidos a partir dos dados do Anexo A entre os binómios de “ingredientação” aplicados. Desta maneira, conseguiram-se determinar os valores, sendo que para serem considerados significativamente estatísticos necessitam de ter  $p < 0.05$  e  $F > F_{\text{crítico}}$ .

**Tabela 22- B1.** Resultados da análise estatística do teste “Anova: fator único” entre os binómios de “ingredientação” da amostra 1 para os valores dentro do limite de deteção da técnica.

Binómio de pasteurização	p	F	F <sub>crítico</sub>
95 °C/120 min.	0.957305	0.003245	7.708647
98 °C/120 min.	0.076113	5.657287	7.708647
99.5 °C/80 min.	0.383087	0.958107	7.708647

**Tabela 23- B2.** Resultados da análise estatística do teste “Anova: fator único” entre os binómios de “ingredientação” da amostra 2 para os valores dentro do limite de deteção da técnica.

Binómio de pasteurização	p	F	F <sub>crítico</sub>
95 °C/120 min.	0.814432	0.06015	5.987378
98 °C/120 min.	0.019923	9.89540	5.987378
99.5 °C/80 min.	0.443997	0.67106	5.987378

**Tabela 24- B3.** Resultados da análise estatística do teste “Anova: fator único” entre os binómios de “ingredientação” da amostra 3 para os valores dentro do limite de deteção da técnica.

Binómio de pasteurização	p	F	F <sub>crítico</sub>
95 °C/120 min.	0.329635	1.125137	5.987378
98 °C/120 min.	0.689558	0.175857	5.987378

## ANEXO C

### Determinação dos parâmetros cinéticos de inativação térmica

Para a determinação dos valores de D foram elaborados vários gráficos, sendo um para cada binómio tempo/temperatura, no Excel. No eixo YY foi considerado o logaritmo de UFC/g em função do tempo de pasteurização (eixo XX). Em seguida, foram obtidas as equações das retas, assim como as regressões lineares a elas associadas, sendo assim possível o cálculo dos valores de D a partir do inverso negativo do declive de cada reta.

Para a determinação dos valores de z, tal como foi feito para os valores de D, vários gráficos foram elaborados, um para cada binómio tempo/temperatura de “ingredientação”, onde no eixo YY foi considerado o logaritmo do valor de D e no eixo XX a temperatura do banho. Obteve-se também, portanto, as equações das retas e as regressões lineares a elas associadas, sendo o valor de z obtido através do inverso do declive de cada reta. Para calcular os parâmetros de cada amostra utilizaram-se os valores do anexo A.

### Valor de D

**Tabela 25- C1.** Cálculos intermédios para a obtenção do valor de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização da amostra 1, com as respetivas equações das retas e regressões.

Binómio de “ingredientação”	Binómio de pasteurização	Valor de D (min.)		
		Equação da reta	$R^2$	D (min.)
50 °C/1h	95 °C/120 min.	$y = -0.0105x + 3.8662$	0.0799	95.24
	98 °C/120 min.	$y = -0.0101x + 3.8552$	0.9722	99.01
	99.5 °C/25 min.	$y = -0.0153x + 3.6390$	0.9351	65.36
60 °C/1h	98 °C/25 min.	$y = -0.0319x + 3.3005$	0.7355	31.35
	99.5 °C/25 min.	$y = -0.1793x + 6.8336$	0.9034	5.577

Quando foi aplicado o binómio tempo/temperatura de “ingredientação” de 60 °C/1h de pasteurização de 95 °C/120 min à amostra 1, obteve-se um valor de D de 12.20, a partir da equação da reta  $y = -0.082x + 4.79$ .

**Tabela 26- C2.** Cálculos intermédios para a obtenção do valor de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização da amostra 2, com as respetivas equações das retas e regressões.

Binómio de “ingredientação”	Binómio de pasteurização	Valor de D (min.)		
		Equação da reta	$R^2$	D (min.)
50 °C/1h	95 °C/120 min.	$y = -0.0144x + 5.0083$	0.6953	69.44
	98 °C/120 min.	$y = -0.0142x + 4.4$	0.9790	70.42
	99.5 °C/80 min.	$y = -0.0413x + 6.1081$	0.9981	24.21
60 °C/1h	95 °C/120 min.	$y = -0.1266x + 4.7713$	0.9500	7.899
	98 °C/25 min.	$y = -0.0384x + 3.795$	0.9975	26.04
	99.5 °C/80 min.	$y = -0.025x + 4.485$	0.9859	40.00

**Tabela 27- C3.** Cálculos intermédios para a obtenção do valor de D para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização da amostra 3, com as respetivas equações das retas e regressões.

Binómio de "ingredientação"	Binómio de pasteurização	Valor de D (min.)		
		Equação da reta	$R^2$	D (min.)
50 °C/1h	95 °C/120 min.	$y = -0.0725x + 4.4007$	0.7254	13.79
	98 °C/120 min.	$y = -0.1479x + 6.046$	0.8593	6.761
60 °C/1h	95 °C/120 min.	$y = -0.134x + 4.5863$	0.8757	7.463
	98 °C/25 min.	$y = -0.0971x + 5.1293$	0.9368	10.30

#### Valor de z

**Tabela 28- C4.** Cálculos intermédios para a obtenção do valor de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização da amostra 1, com as respetivas equações das retas e regressões.

Binómio de "ingredientação"	Binómio de pasteurização	Valor de z (°C)			
		Log D	Equação da reta	$R^2$	Z (°C)
50 °C/1h	95 °C/120 min.	1.98	$y = -0.0997x + 11.485$	0.8664	10.03
	98 °C/120 min.	1.82			
	99.5 °C/80 min.	1.50			
60 °C/1h	95 °C/120 min.	2.00	$y = -0.2813x + 28.699$	0.9955	3.555
	98 °C/25 min.	1.09			
	99.5 °C/80 min.	0.75			

**Tabela 29- C5.** Cálculos intermédios para a obtenção do valor de z para cada binómio tempo/temperatura de pasteurização da amostra 2, com as respetivas equações das retas e regressões.

Binómio de "ingredientação"	Binómio de pasteurização	Valor de z (°C)			
		Log D	Equação da reta	$R^2$	Z (°C)
50 °C/1h	95 °C/120 min.	1.84	$y = -0.1029x + 11.582$	0.8517	9.718
	98 °C/120 min.	1.38			
	99.5 °C/80 min.	1.42			

Binómio de "ingredientação"	Binómio de pasteurização	Log D	Equação da reta	$R^2$	Z (°C)
60 °C/1h	95 °C/120 min.	1.85	$y = -0.092x + 10.423$	0.1828	10.87
	98 °C/120 min.	0.90			
	99.5 °C/80 min.	1.60			

Quando foi aplicado o binómio tempo/temperatura de "ingredientação" de 50 °C/1h à amostra 3 obteve-se um valor de logaritmo de D de 1.14 (a 95 °C) e de 0.87 (a 98 °C) e de z de 11.25, a partir da equação da reta  $y = -0.0889x + 9.5873$ . Já para o binómio tempo/temperatura de "ingredientação" de 60 °C/1h obteve-se um valor de logaritmo de D de 0.83 (a 95 °C) e de 1.01 (a 98 °C) e de z de 16.42, a partir da equação da reta  $y = -0.0609x + 4.957$ .