

ÍNDICE GERAL

	Pág.
Índice de Tabelas	IV
Índice de Figuras	V
Lista de abreviaturas e símbolos químicos	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJECTIVOS	3
2.1 ENQUADRAMENTO E JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO	3
2.2 OBJECTIVOS DO ESTUDO	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 TENDÊNCIAS NO CONSUMO ALIMENTAR EM PORTUGAL	5
3.1.1 O consumo de refeições pré-preparadas	5
3.1.2 O bacalhau como ingrediente de alimentos pré-confeccionados	7
3.2 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS	7
3.2.1 Generalidades	7
3.2.2 Breve nota histórica	9
3.2.3 Tecnologias de conservação de alimentos	9
3.2.3.1 O método “cook-chill”	11
3.2.3.2 O método “cook-freeze”	16
3.2.3.3 Tecnologia de barreiras	21
3.2.3.4 Tecnologia de barreiras aplicada ao método “cook-chill”	23
3.2.4 Evolução das tecnologias de conservação de alimentos	25
3.3 ESTUDOS DE VIDA ÚTIL DE GÉNEROS ALIMENTÍCIOS	26
3.3.1 Conceito de vida útil	26
3.3.1.1 Factores que influenciam a vida útil	27
3.3.2 Definição de estudo de vida útil	28
3.3.3 A crescente necessidade dos estudos de vida útil	28
3.3.4 Delineamento de um estudo de vida útil	29
3.3.5 Aplicação de uma margem de segurança à vida útil	30
3.3.6 Indicadores nas análises de vida útil	31

3.3.6.1	Avaliação sensorial nos estudos de vida útil	31
3.3.6.1.1	O método “Weibull Hazard”	32
3.3.6.2	Avaliação objectiva nos estudos de vida útil de alimentos	33
3.3.6.2.1	Análise microbiológica	33
3.3.6.2.2	Análise físico-química	35
3.3.7	Métodos de estudos de vida útil	35
3.3.7.1	Métodos directos	35
3.3.7.2	Métodos indirectos	37
4.	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	PROCESSO DE FABRICO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	43
4.2	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, QUÍMICAS E SENSORIAIS DAS AMOSTRAS	46
4.2.1	Análises microbiológicas	47
4.2.1.1	Preparação da amostra	47
4.2.1.2	Preparação das diluições	48
4.2.1.3	Contagem de microrganismos a 30°C	48
4.2.1.4	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	48
4.2.1.5	Contagem de <i>Escherichia coli</i>	49
4.2.1.6	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	49
4.2.1.7	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	49
4.2.1.8	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positivo	50
4.2.1.9	Contagem de microrganismos psicrótrópicos	50
4.2.2	Análises físico-químicas	51
4.2.2.1	Determinação do potencial hidrogeniónico (pH)	51
4.2.2.2	Determinação do azoto básico volátil total (ABVT)	51
4.2.2.3	Determinação índice do ácido tiobarbitúrico (TBA)	51
4.2.2.4	Monitorização da temperatura	52
4.2.3	Análise sensorial	52
4.2.3.1	Constituição do painel	53
4.2.3.2	Preparação e apresentação das amostras	53
4.2.3.3	Ficha de análise	53

	Pág.
5. ANÁLISE DOS DADOS	54
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	55
6.1.1 Contagem de microrganismos a 30°C	55
6.1.2 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	57
6.1.3 Contagem de <i>Escherichia coli</i>	57
6.1.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	57
6.1.5 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	57
6.1.6 Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positivo	57
6.1.7 Contagem de microrganismos psicotróficos	57
6.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	58
6.2.1 Determinação do pH	58
6.2.2 Determinação do azoto básico volátil total (ABVT)	59
6.2.3 Determinação índice do ácido tiobarbitúrico (TBA)	60
6.3 ANÁLISE SENSORIAL	61
6.3.1 Atributo aspecto	61
6.3.2 Atributo cor	63
6.3.3 Atributo cheiro	65
6.3.4 Atributo sabor	66
6.3.5 Atributo textura	67
6.3.6 Atributo cremosidade	68
6.4 MONITORIZAÇÃO DA TEMPERATURA	69
7. VIDA ÚTIL ATRIBUÍDA ÀS AMOSTRAS EM ESTUDO	70
8. CONCLUSÃO	71
9. BIBLIOGRAFIA	75
ANEXO I	
ANEXO II	
ANEXO III	
ANEXO IV	
ANEXO V	

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.	
Tabela 1	Consumo de alimentos congelados e pré-confeccionados ou pré-preparados em Portugal Continental (adaptado de Paixão, 2005)	6
Tabela 2	Técnicas antimicrobianas de conservação alimentar existentes e emergentes (adaptado de Gould, 1996)	10
Tabela 3	Binómios tempo-temperatura equivalentes para obter uma redução 6D de <i>Listeria monocytogenes</i> (Food Safety Authority of Ireland, 2006)	13
Tabela 4	Binómios tempo-temperatura equivalentes para obter uma redução 6D de <i>C. botulinum</i> tipo B psicrotrófico não-proteolítico (European Food Safety Authority, 2005)	14
Tabela 5	Requisitos para arrefecimento rápido de alimentos confeccionados na Europa (Evans <i>et al.</i> , 1996)	15
Tabela 6	Factores que influenciam o comportamento das microrganismos durante a conservação da congelação (adaptado de Geiges, 1996)	19
Tabela 7	Tecnologias de barreira aplicáveis a refeições “cook-chill” (Rybka-Rodgers, 2001)	24
Tabela 8	Questões a considerar antes de implementar o método “cook-chill”/ “cook-freeze” (Food Safety Authority of Ireland, 2006)	25
Tabela 9	Questões a considerar no início do estudo de vida útil de um alimento (adaptado de Hough, 2006)	30
Tabela 10	As seis etapas utilizadas no método directo para a determinação da vida útil de alimentos (adaptado de New Zeland Food Safety Authority, 2005, Labuza & Fu, 1997)	36
Tabela 11	Condições comumente utilizadas nos estudos acelerados de vida útil e seus efeitos nos alimentos (Hough, 2006)	40
Tabela 12	Microrganismos patogénicos indicados para estudos de desafio em diferentes alimentos (Vestergaard, 2001)	42
Tabela 13	Delineamento experimental	46

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Fluxograma do método “cook-chill” (Food Safety Authority of Ireland, 2006)	12
Figura 2	Fluxograma do método “cook-freeze”	17
Figura 3	Mistura final e cozedura do bacalhau com natas	43
Figura 4	Lote “cook-chill” (A) na célula de arrefecimento rápido e lote “cook-freeze” (B) à entrada do túnel de congelação	44
Figura 5	Introdução das sondas “data-loggers” nos tabuleiros.	44
Figura 6	Acabamento da embalagem	45
Figura 7	Caixa isotérmica de transporte de refeições refrigeradas e congeladas	45
Figura 8	Amostra antes da pesagem	47
Figura 9	Evolução das contagens de microrganismos a 30°C nas amostras “cook-chill”, ao longo do tempo de estudo.	55
Figura 10	Evolução das contagens de microrganismos a 30°C nas amostras “cook-freeze”, ao longo do tempo de estudo.	56
Figura 11	Média dos valores do pH nas amostras “cook-chill”, ao longo do tempo de estudo	58
Figura 12	Média dos valores do pH nas amostras “cook-freeze”, ao longo do tempo de estudo.	58
Figura 13	Valores de Azoto Básico Volátil Total (ABVT), expresso em mg de NH ₃ / 100 g de produto, nas amostras “cook-chill”, ao longo do tempo de estudo.	59
Figura 14	Valores de Azoto Básico Volátil Total (ABVT), expresso em mg de NH ₃ / 100 g de produto, nas amostras “cook-freeze”, ao longo do tempo de estudo.	59
Figura 15	Valores do Índice de Ácido Tiobarbitúrico (TBA), expresso em mg aldeído malónico/ 1000 g de produto, nas amostras “cook-chill”, ao longo do tempo de estudo.	60
Figura 16	Valores do Índice de Ácido Tiobarbitúrico (TBA), expresso em mg aldeído malónico/ 1000 g de produto, nas amostras “cook-freeze”, ao longo do tempo de estudo.	61
Figura 17	Classificação do atributo aspecto no bacalhau com natas “cook-chill”, ao longo do estudo	62

		Pág.
Figura 18	Classificação do atributo aspecto no bacalhau com natas “cook-freeze”, ao longo do estudo.	63
Figura 19	Classificação do atributo cor nas amostras “cook-chill”, ao longo do estudo.	64
Figura 20	Classificação do atributo cor nas amostras “cook-freeze”, ao longo do estudo.	64
Figura 21	Classificação do atributo cheiro nas amostras “cook-chill”, ao longo dos oito dias de estudo.	65
Figura 22	Classificação do atributo cheiro nas amostras “cook-freeze” durante os seis meses de estudo.	65
Figura 23	Classificação do atributo sabor nas amostras “cook-chill”, ao longo do estudo.	66
Figura 24	Classificação do atributo sabor nas amostras “cook-freeze”, ao longo do estudo.	66
Figura 25	Classificação do atributo textura nas amostras “cook-chill” ao longo do estudo.	67
Figura 26	Classificação do atributo textura nas amostras “cook-freeze” ao longo do estudo.	67
Figura 27	Classificação do atributo cremosidade nas amostras “cook-chill”, ao longo do estudo.	68
Figura 28	Classificação do atributo cremosidade nas amostras “cook-freeze”, ao longo do estudo.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS QUÍMICOS

ABVT – Azoto básico volátil total

APT – Água Peptonada Tamponada

CPET – tereftalato de polietileno cristalizado

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HACCP – Hazard analysis and critical control points

Log – Logaritmo de base 10

NH₃ – Amoníaco

PA – Poliamida

PE – Polietileno

PET – tereftalato de polietileno

TBA – Ácido tiobarbitúrico

Valor D – Tempo de redução decimal

1. INTRODUÇÃO

Assiste-se na actualidade a uma crescente produção intensiva de produtos primários e transformados, para além de novos tipos de produtos alimentares que incluem os pré-preparados, pré-cozinhados ou produtos prontos a consumir, destinados a um público consumidor cada vez mais alargado e exigente (Evans, 1996) e que valoriza sobretudo a rapidez e a facilidade de preparação de refeições (Creed, 2001).

As profundas mudanças sociais e políticas verificadas nas últimas décadas no estilo de vida da população portuguesa, conduziram a um comportamento diferente no que diz respeito ao consumo alimentar (Barreto, 1998).

Entre os factores que influenciam e condicionam fortemente os hábitos e as rotinas de consumo alimentar estão: a entrada da mulher no mercado de trabalho, a migração das populações para as grandes cidades (Evans, 1996), a diminuição do número de membros do agregado familiar, o aumento do número de indivíduos divorciados ou que vivem sozinhos e o aumento da distância emprego-casa.

Nos últimos 30 anos, foram desenvolvidos vários tipos de processamento alimentar, tais como o “cook-freeze”, “cook-chill” e o “sous-vide” (Loiseau & Aznar, 1988; Light & Walker, 1990 citados por Creed, 2001). Estes métodos permitem aumentar a vida útil dos alimentos, através da combinação de um processamento térmico suave com o armazenamento a baixas temperaturas, mas sem recorrer à adição de conservantes ou aditivos (Light & Walker, 1990 citados por Creed, 2001).

O aumento no número de referências de refeições e produtos pré-preparados, especificamente desenvolvidos para o consumidor português (como os pratos de bacalhau à Brás, com natas ou no forno), traduzem a dimensão da mudança.

De acordo com um inquérito conduzido em Portugal em 2005, a pedido da então Agência Portuguesa de Segurança Alimentar, e cujo objectivo central era a obtenção de informação acerca dos comportamentos e percepções dos consumidores face aos riscos alimentares e o seu impacto nas decisões de compra, os pratos pré-confeccionados/ congelados apresentavam entre outras vantagens, a poupança de tempo e trabalho e o facto de serem facilmente acessíveis. Porém, como principais desvantagens surgiram: a sugestão de serem produtos com conservantes e o facto de possuírem um sabor algo artificial e menos autêntico/tradicional (Paixão, 2005).

Considerando os resultados do inquérito, o alimento seleccionado para o desenvolvimento do presente estudo foi “bacalhau com natas”, tendo em conta que o

bacalhau é um produto muito tradicional na alimentação portuguesa e que o referido alimento não foi adicionado de quaisquer agentes conservantes.

Deste modo, propomo-nos neste trabalho a avaliar a segurança microbiológica do referido alimento preparado segundo o método “cook-chill” e “cook-freeze” durante oito dias e seis meses, respectivamente, bem como a avaliar a percepção do consumidor em relação a alguns atributos organolépticos das referidas refeições.

2. OBJECTIVOS

2.1 ENQUADRAMENTO E JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

Na União Europeia, foram estabelecidos critérios microbiológicos para alimentos específicos. Estes critérios são aplicáveis ao longo de toda a cadeia alimentar, desde o produtor de alimentos, às importações e a todo o comércio alimentar intra-comunitário. Assim, os géneros alimentícios não devem conter microrganismos, suas toxinas e metabolitos em quantidade que represente um risco inaceitável para a saúde humana. O Regulamento (CE) n.º 178/2002, de 28 de Janeiro de 2002, estabelece requisitos de segurança alimentar, de acordo com os quais os géneros alimentícios não seguros não poderão ser comercializados.

A vida útil dos géneros alimentícios é parte integrante da segurança alimentar. O *Codex Alimentarius* define vida útil de um alimento como “o período durante o qual um género alimentício mantém a segurança microbiológica, a uma temperatura de armazenamento especificada”.

A actual legislação relativa à análise microbiológica de géneros alimentícios encontra-se contemplada no Regulamento (CE) n.º 2073/2005, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, no Regulamento (CE) n.º 853/2004, de 29 de Abril, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal (com critérios microbiológicos para leite cru de vaca e de outras espécies) e ainda, no caso português, na Portaria n.º 65/90, de 26 de Janeiro, relativa aos critérios microbiológicos para apreciação das características dos bolos e cremes de pastelaria. O Regulamento (CE) n.º 2073/2005, de 15 de Novembro de 2005, define como período de vida útil o “período correspondente ao intervalo de tempo que precede a data limite de consumo dos produtos, ou a data de durabilidade mínima, conforme definidas nos artigos 9º e 10º da Directiva 2000/13/CE”. De acordo com esta Directiva, a expressão “Data de durabilidade mínima” descreve a vida útil de um género alimentício e corresponde à data até à qual um género alimentício mantém as suas propriedades específicas, quando armazenado de forma adequada. Quando o alimento ultrapassa a sua data de durabilidade mínima não significa, necessariamente, que deixou de ser seguro, mas poderá já não apresentar a sua máxima qualidade. Geralmente, a data de durabilidade mínima é utilizada em alimentos enlatados, secos, congelados e também nos submetidos ao método “cook-freeze”.

Todos os alimentos que, do ponto de vista microbiológico, são altamente perecíveis e como tal susceptíveis de, após um curto intervalo de tempo, constituir um

perigo para a saúde humana deverão ser marcados com data limite de consumo. A data limite de consumo indica a data até à qual o género alimentício pode ser consumido com segurança. A determinação da data limite de consumo é crítica para a segurança do produto. É esta última que se aplica aos alimentos submetidos ao método “cook-chill”. Deste modo, a vida útil de um alimento tanto pode corresponder ao período que precede a data de durabilidade mínima, como o que antecede a data limite de consumo.

De facto, a Directiva 2000/13/CE, define e estabelece em que circunstâncias são mencionadas na rotulagem dos géneros alimentícios a data limite de consumo e a data de durabilidade mínima. Porém, nada refere relativamente à forma como são determinadas as referidas datas, subentendendo-se que a responsabilidade pela sua determinação é do produtor do alimento. Apesar de não existir nenhum sistema de atribuição de validade oficialmente recomendado, existe a obrigatoriedade legal de mencionar o prazo de validade dos alimentos na respectiva rotulagem.

Portanto, para um alimento ser viável do ponto de vista comercial, o operador económico deverá ser capaz de produzir, de modo sistemático, alimentos com segurança microbiológica aceitável. A vida útil de um alimento baseia-se na sobrevivência e crescimento de microrganismos de alteração e/ ou patogénicos, pelo que uma vida útil mal estimada pode colocar em risco a saúde do consumidor. Tendo em conta o aumento da procura de refeições pré-preparadas e considerando o aumento no tempo de prateleira dessas refeições, quando comparadas com refeições tradicionais, surge a necessidade, de modo expedito e simples, determinar qual a validade dessas refeições.

2.2. OBJECTIVOS DO ESTUDO

O presente estudo tem como objectivo principal a análise de vida útil de alimentos submetidos ao método “cook-chill” e “cook-freeze”, através da realização de provas microbiológicas, físico-químicas e organolépticas.

Também é objectivo do presente trabalho o delineamento, na medida do possível, de um protocolo analítico genérico, de fácil aplicação, que permita a análise de refeições preparadas pelos mesmos métodos.

Por fim, e como último objectivo, este trabalho procura compilar informação actual que sirva de suporte a estudos futuros.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TENDÊNCIAS NO CONSUMO ALIMENTAR EM PORTUGAL

3.1.1 O consumo de refeições pré-preparadas

Na sociedade actual, altamente urbanizada, os alimentos são, na maioria das vezes, produzidos a grande distância do local onde irão ser consumidos e mesmo os alimentos perecíveis, até há pouco tempo disponíveis apenas na sua época, são exigidos pelo consumidor durante todo o ano (Labuza, 2000).

O consumidor actual é mais sofisticado e procura, cada vez mais, alimentos sensorialmente apelativos, que sejam fáceis de preparar e usar, nutricionalmente superiores e de longa duração. Simultaneamente, também são procurados alimentos com menos aditivos e conservantes e minimamente processados. Estas exigências do consumidor, aparentemente incompatíveis, requerem uma intensa optimização do processo produtivo e uma abordagem inovadora (Labuza, 2000).

O consumidor tem o direito de adquirir alimentos que não possuam microrganismos potencialmente patogénicos e que não possuam quaisquer sinais de alteração, de origem microbiana (Geiges, 1996). Estes dois requisitos deverão ser conciliados, num mercado fortemente competitivo, com a procura por parte do consumidor, de alimentos minimamente processados tecnologicamente e ao mesmo tempo, com uma vida útil prolongada (Baptista & Venâncio, 2003).

Nos últimos anos, as refeições prontas a consumir refrigeradas têm vindo a ganhar popularidade, quando comparadas com as tradicionais refeições caseiras (Rodgers, 2004). Também existe uma tendência global para o aumento do consumo de refeições minimamente processadas (como as “cook-chill” e “sous-vide”), quer em casa, quer na restauração (Paixão, 2005). As refeições prontas a consumir também são cada vez mais usadas em hospitais e lares de idosos, onde a população alvo é, na sua maioria, imuno-comprometida (Nissen *et al.*, 2002).

Por outro lado, o consumidor procura cada vez mais alimentos com poucos aditivos e cuja utilização seja cómoda e prática (Tyrer *et al.*, 2004), o que acontece neste tipo de alimentos.

De referir também que o consumidor é influenciado por atitudes formadas ao longo dos anos, através da sua própria experiência e nível cultural, pelo poder dominante da publicidade e do marketing, expectativas sobre a qualidade dos alimentos e efeito da situação social e ambiente circundante (Cardello, 1996, citado por Creed, 2001).

O conceito de consumo caseiro de uma refeição fabricada integralmente fora tornou-se muito mais aceitável, devido às mudanças de estilo de vida que influenciam os hábitos familiares: estrutura familiar e redistribuição dos rendimentos (Creed, 2001).

Em 2005, a pedido da Agência Portuguesa de Segurança Alimentar foi conduzido um estudo de mercado em Portugal Continental, com o objectivo de perceber quais os comportamentos e percepções dos consumidores face aos perigos alimentares e o seu impacto nas decisões de compra. Neste estudo, os inquiridos foram agrupados em três perfis de consumidores, consoante a sua atitude e comportamento face à alimentação: os nada/ pouco preocupados; os preocupados; os naturalistas. Quando inquirido acerca do consumo de alimentos congelados e/ou pré-confeccionados, cada perfil indicou o tipo de consumo, as vantagens e as desvantagens do mesmo, conforme é possível ver no resumo que se encontra na Tabela 1.

Tabela 1 – Consumo de alimentos congelados e pré-confeccionados ou pré-preparados em Portugal Continental (adaptado de Paixão, 2005)

	Os Nada/ Pouco Preocupados	Os Preocupados	Os Naturalistas
Frequência e variedade de consumo	Frequente; grande variedade de produtos	Ocasional; leque limitado de produtos	Pontual e com resistência
Vantagens	Rapidez, praticidade, não prejudicam alimentação saudável	Rapidez e Facilidade de preparação	Facilidade de preparação
Desvantagens	Preço; se consumidos em excesso poderão ser nocivos	Não são produto fresco; sugerem conservantes e químicos; sabor artificial e menos autêntico	Não são saudáveis; valor nutricional inferior; têm químicos, conservantes; têm validade longa
Alimentos mais consumidos	Pizzas; lasanha e canelonis, hamburgueres, batatas fritas, salgados variados, puré, bróculos, ervilhas e favas, bacalhau à brás e com natas	Bacalhau à brás e com natas, lasanha e canelonis, arroz à Valenciana, cebola e alho, esparregado e vegetais	Pizza e lasanha

Ainda o mesmo estudo, aponta os alimentos congelados pré-cozinhados como as pizzas e os pratos de bacalhau, as saladas e legumes pré-lavados, produtos pré-embalados que vão ao microondas e os vegetais congelados como produtos cujo consumo irá sofrer no futuro um aumento (Paixão, 2005).

3.1.2 O bacalhau como ingrediente de alimentos pré-confeccionados

Durante séculos, o bacalhau (*Gadus morhua*) foi a espécie mais importante na pesca comercial do Atlântico Norte.

Com um consumo de oito a nove quilogramas por ano, *per capita*, Portugal é o maior consumidor mundial de bacalhau seco e a granel. Mais de 90% é importado, sendo a Islândia, a Noruega, a Rússia e a Dinamarca os principais fornecedores de bacalhau (seco e também fresco, este para ser salgado e processado no país). Em 2005, o país importou 85,4 mil toneladas de bacalhau (Anónimo, 2006).

Contudo, do final dos anos 80 até à actualidade, Portugal viu a sua quota de pesca de bacalhau reduzida para um décimo (Barros, 2003).

Como consequência e fruto da grande adaptação do sector às necessidades do mercado e às tendências de consumo, Portugal introduziu uma série de conceitos novos na comercialização de bacalhau. Actualmente, a tendência de comercialização são os pratos pré-preparados à base de bacalhau (Duun, 2007). Uma prova da capacidade portuguesa para liderar o mercado do bacalhau foram inovações como a comercialização do peixe já demolido, ou ainda as refeições de bacalhau pré-cozinhadas (Barros, 2003), como por exemplo o bacalhau com natas.

3.2. CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

3.2.1 Generalidades

Com poucas excepções, todos os alimentos perdem qualidade e vida útil potencial, em maior ou menor grau, após a colheita, abate ou preparação (Creed, 2001).

De um modo genérico, pode afirmar-se que a conservação de alimentos é baseada na prevenção ou protelação do crescimento microbiano. Portanto, para aumentar a vida útil dos alimentos dever-se-á incidir nos poucos factores que influenciam eficientemente a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos e que são essencialmente físicos, outros predominantemente químicos e outros predominantemente microbianos, dependendo da natureza dos microrganismos presentes (Duun, 2007). Estes factores foram classificados de várias formas, mas a *International Commission of Microbiological Specifications for Foods* (1980) e Huis in't Veld (1996) classificam-nos como factores intrínsecos, factores processuais, factores extrínsecos e factores implícitos. Adicionalmente, cada um destes factores influenciam fortemente os restantes, pelo que o efeito da combinação poderá não ser imediatamente previsível (Gould, 1996).

As várias formas de alteração microbiana podem ser evitadas com recurso a técnicas da conservação, que impeçam ou inibam o crescimento microbiano, tais como o arrefecimento rápido, a congelação, a seca, a cura, a embalagem protectora, a acidificação, a fermentação e a adição de conservantes (Huis in't Veld, 1996 e Marth, 1998). Algumas técnicas, como a pasteurização, a apertização e a irradiação, actuam por inactivação dos microrganismos. Outras técnicas restringem o acesso dos microrganismos aos alimentos, como o processamento e a embalagem asséptica (Rybka-Rodgers, 2001). As técnicas de conservação mais recentes actuam pela inactivação microbiana, como a alta pressão, a electroporação, a manotermossonicação e a adição de enzimas bacteriolíticas (Gould, 1996).

Simultaneamente, emerge a preocupação sobre o consumo de alimentos muito processados, pelo que surge a tendência para o uso de métodos que assegurem produtos mais naturais, de alta qualidade, com menos conservantes e aditivos e mais saudáveis do ponto de vista nutritivo. Deste modo, surgiu a necessidade de desenvolver procedimentos de conservação alimentar menos severos e que combinam factores de conservação, como a tecnologia de barreiras, de forma a assegurar um menor dano à qualidade do alimento e que possibilitem uma vida útil mais prolongada (Gould, 1996).

Muitas das técnicas existentes e emergentes de conservação de alimentos actuam por interferência com os mecanismos homeostáticos que os microrganismos desenvolveram para sobreviver ao stresse ambiental extremo (Gould, 1996).

3.2.2 Breve nota histórica

O calor e o frio são os processos físicos há mais tempo utilizados na conservação de alimentos. O aquecimento dos alimentos, será, com certeza, o método mais antigo, pois seria mais fácil aquecer com o fogo do que produzir baixas temperaturas, independentemente das condições climatéricas. Por outro lado, onde quer que existisse gelo, esta era utilizada para a conservação de alimentos desde tempos primitivos (Gould, 1996).

As primeiras instalações refrigeradas surgiram em Chicago, Estados Unidos da América, em 1878 e dois anos mais tarde, em 1890, foi efectuado o primeiro transporte de carne congelada entre a Argentina e França. Os primeiros frigoríficos domésticos surgiram em 1910. Em 1925, iniciou-se nos Estados Unidos da América, a comercialização de alimentos congelados. A partir de 1950 deu-se a massificação de vendas de frigoríficos e a partir de 1960 de congeladores (Institute of Food Safety and Technology, 2007). Actualmente, apesar da tecnologia aplicável à congelação e à ultracongelação aparentar não levantar mais problemas técnicos, verifica-se a dificuldade prática de manter constante a temperatura nos equipamentos de refrigeração e de congelação (Rodgers, 2004 e Food Safety Authority of Ireland, 2006).

3.2.3 Tecnologias de conservação de alimentos

A Tabela 2 apresenta algumas das tecnologias existentes e emergentes para a conservação de alimentos. É importante salientar que a maioria destas técnicas reduz ou, nalguns casos, inibe completamente o crescimento microbiano. As novas técnicas, que constituem uma reacção às necessidades dos consumidores, incluem abordagens mais naturais como a embalagem em atmosfera protectora, o uso de culturas fermentativas, as bacteriocinas e algumas enzimas (Gould, 1996).

Tabela 2 – Técnicas antimicrobianas de conservação alimentar existentes e emergentes (adaptado de Gould, 1996)

Objectivo	Factor de conservação	Método aplicado
Redução ou inibição do crescimento microbiano	Baixa temperatura	Refrigeração e Congelação
	Baixa actividade da água	Seca, Cura
	Oxigénio reduzido	Embalagem em azoto ou em vácuo
	Dióxido de carbono aumentado	Embalagem em atmosfera protectora
	Acidificação	Adicção de ácidos; fermentação
	Fermentação alcoólica	Vinificação, fermentação da cerveja
	Uso de conservantes	Adicção de conservantes: inorgânicos (sulfitos, nitritos); orgânicos (propionatos, sorbatos, benzoatos, parabenos); antibióticos (nisina, natamicina)
Inactivação microbiana	Alta temperatura	Pasteurização e esterilização
	Irradiação	Irradiação ionizante
	Pressurização	Aplicação de alta pressão hidrostática
	Electroporação	Descarga eléctrica de alta voltagem
	Mano-termo-sonicação	Aquecimento com ultrasonicação a pressão elevada
Restrição do acesso microbiano	Lise celular	Adicção de enzimas bacteriolíticas (lisozima)
		Processamento e/ ou embalagem asséptica

Contrastando com as técnicas inibitórias, algumas actuam por inactivação dos microrganismos alvo, sendo o aquecimento a que melhor cumpre esse fim. Contudo, é interessante verificar que a maioria das novas tecnologias actua por inactivação

directa: irradiação, aplicação de pressão hidrostática elevada, descarga eléctrica de alta voltagem (electroporação), ultrasonicação combinada com alta temperatura e pressão aumentada (manotermossonicação) e junção de enzimas bacteriolíticas (lisozima).

As técnicas de conservação alimentar mais aplicadas actualmente, para a prevenção da alteração dos alimentos, são a redução da temperatura, redução do pH, redução da actividade da água e aplicação do calor. Contudo, estas e outras técnicas são cada vez mais usadas conjuntamente (tecnologia de barreiras) (Leistner, 1995, citado por Gould, 1996).

3.2.3.1 O método “cook-chill”

O método “cook-chill” consiste em confeccionar os alimentos, em seguida arrefecê-los rapidamente e armazená-los a uma temperatura acima do ponto de congelação (0º a 3ºC), até à regeneração e/ ou serviço (Food Safety Authority of Ireland, 2006).

Como o tratamento térmico que estes produtos recebem não é suficiente para garantir a sua esterilidade comercial, a refrigeração é um importante obstáculo, que retarda a deterioração do alimento, assim como o crescimento da maioria dos microrganismos patogénicos (*Codex Alimentarius Commission*, 1999).

O sucesso do método resulta da inactivação das formas vegetativas, durante a confecção, e também do facto de os esporos das bactérias psicrotróficas serem, geralmente, mais sensíveis à elevação da temperatura do que os dos mesófilos e termófilos (Gould, 1996); portanto, a confecção ligeira destrói a fracção psicrotrófica da flora de alteração, mas o facto de ser ligeira garante que o produto não sofre alteração organoléptica significativa (Holdsworth, 2004).

A Figura 1 descreve o fluxograma típico de um alimento preparado pelo método “cook-chill”.

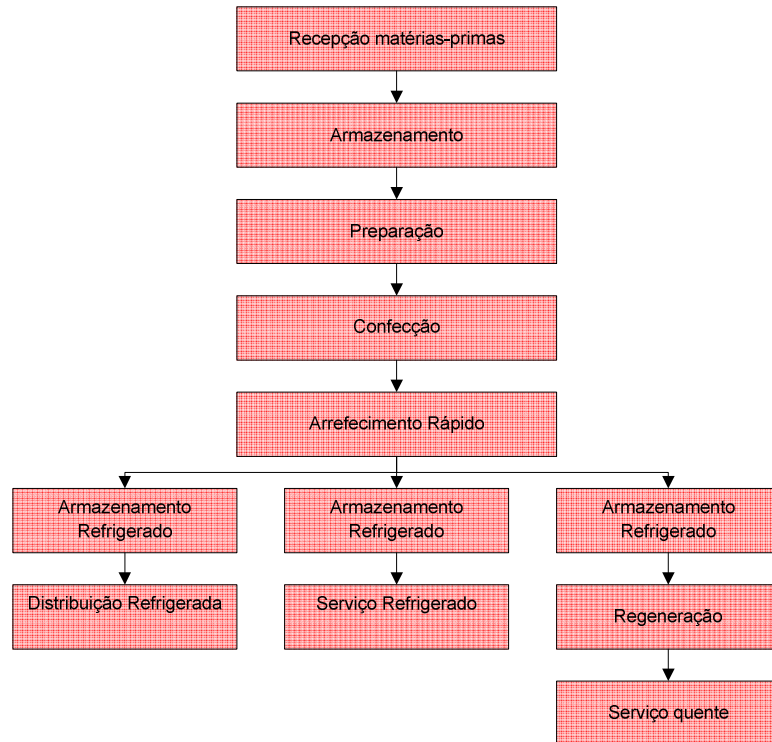


Figura 1 – Fluxograma do método “cook-chill” (Food Safety Authority of Ireland, 2006)

Para garantir a segurança do método é necessário compreender os factores que afectam os processos térmicos.

Para cada patógeno alvo existe um tempo específico a uma dada temperatura que garante a destruição de 90% de todas as células vegetativas e/ ou esporos presentes. Este tempo, em minutos, é o tempo de redução decimal ou Valor D (Holdsworth, 2004). O Valor D é específico para um determinado microrganismo e expressa a severidade do tratamento térmico (Holdsworth, 2004).

Um tratamento térmico deve ser estudado de modo a inactivar um patógeno ou grupo de patógenos (Food Safety Authority of Ireland, 2006). Considerando o tipo de alimento e a vida útil desejada, dever-se-á identificar o patógeno alvo para o tratamento térmico, de modo a garantir a segurança do alimento durante toda a vida útil (Holdsworth, 2004).

A inativação dos microrganismos patogénicos depende das características destes, da vida útil desejada para o alimento e das características intrínsecas e extrínsecas do alimento (Gaze, 2005).

A *Listeria monocytogenes* é considerada a bactéria patogénica não produtora de esporos mais resistente ao tratamento térmico (Rybka-Rodgers, 2001, Rodgers, 2004). Portanto, um tratamento térmico que seja eficaz para *L. monocytogenes*, também o será para outras formas vegetativas de bactérias patogénicas não produtoras de esporos como *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *V. parahaemolyticus* e *E. coli* O157:H7 que possam estar presentes no alimento.

Muitos autores recomendam um binómio tempo-temperatura de 70°C durante 2 minutos para uma redução de 6D de *L. monocytogenes* (Evans *et al.*, 1996, Gould, 1996, Rybka-Rodgers, 2001, Gaze, 2006). Na Tabela 3, encontram-se outros binómios tempo-temperatura igualmente eficazes.

Tabela 3 – Binómios tempo-temperatura equivalentes para obter uma redução 6D de *Listeria monocytogenes* (Food Safety Authority of Ireland, 2006)

Temperatura (°C)	Tempo	Temperatura (°C)	Tempo
63	17.5 minutos	70	2.0 minutos
64	13.0 minutos	71	1.5 minutos
65	9.5 minutos	72	1.0 minutos
66	7.0 minutos	73	47 segundos
67	5.0 minutos	74	35 segundos
68	4.0 minutos	75	26 segundos
69	3.0 minutos	76	19 segundos

Porém, quando a análise de perigos do processamento indica que existe o risco de desenvolvimento e produção de toxinas de *Clostridium botulinum* ou de outras bactérias produtoras de esporos, poderá ser necessária a aplicação de outros binómios tempo-temperatura ou outro tipo de controlo. O risco de aparecimento de *C. botulinum* depende da sua existência (ou dos seus esporos) nas matérias-primas, da ausência de factores de controlo (como $\text{pH} \leq 4,5$; $a_w \leq 0,97$) e de um ambiente anaeróbio (Betts, 1996).

O *C. botulinum* tipo B psicrotrófico não proteolítico é a forma mais resistente ao tratamento térmico de *C. botulinum*. Como tal, todas as formas vegetativas de

microrganismos patogénicos não formadores de esporos, incluindo *Listeria monocytogenes* que possam estar presentes no alimento também poderão ser destruídas pelos binómios tempo-temperatura indicados na Tabela 4. De acordo com Lund & Peck (1994), citados por Gould (1996), o aquecimento deverá ser equivalente a 90°C durante 10 minutos, sendo este binómio suficiente para assegurar a inactivação dos esporos de microrganismos psicrotróficos patogénicos.

Tabela 4 – Binómios tempo-temperatura equivalentes para obter uma redução 6D de *C. botulinum* tipo B psicrotrófico não-proteolítico (European Food Safety Authority, 2005)

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
77	278	84	46
78	215	85	36
79	167	86	28
80	129	87	22
81	100	88	17
82	77	89	13
83	60	90	10

O *C. botulinum* é considerado a maior ameaça à segurança de refeições pasteurizadas refrigeradas (Mossel, 1991) e um número significativo de estudos demonstram a sua capacidade para produzir toxina em alimentos “sous-vide” (Betts & Gaze, 1995, citados por Rybka-Rodgers, 2001).

Porém, existe sempre a possibilidade de alguns microrganismos produtores de esporos, como *Bacillus cereus* e *C. botulinum*, não serem destruídos pelo processo de confecção (Evans *et al.*, 1996, Sprenger, 2002). Por esta razão, a temperatura do produto deverá ser rapidamente reduzida até 7°C para prevenir a germinação dos esporos e sua posterior multiplicação. Por esta razão é recomendável que o processo de arrefecimento seja iniciado logo após ou, no máximo, 30 minutos depois do processo de confecção (Evans *et al.*, 1996, Gaze, 2006). De acordo com Sprenger (2002), o referido arrefecimento deverá demorar até cerca de 90 minutos. Já o *Codex Alimentarius* (1999) recomenda que a temperatura do alimento no centro térmico deverá ser reduzida abaixo dos 10°C em menos de 2 horas. Para além do possível controlo sobre os microrganismos, a redução rápida da temperatura de um alimento

auxilia a retenção de nutrientes (Evans *et al.*, 1996).

Como algumas estirpes de *B. cereus* conseguem desenvolver-se abaixo dos 8°C e certas estirpes de *C. botulinum* conseguem produzir toxina em refrigeração, é essencial a monitorização estrita dos binómios tempo-temperatura do arrefecimento e da armazenagem, ao longo da vida útil do produto (Sprenger, 2002). Por esse motivo e também para reduzir o crescimento da flora de alteração, o arrefecimento rápido deverá ser prolongado até aos 3°C (Evans *et al.*, 1996, Gaze, 2006).

Em muitos Estados da União Europeia existem recomendações oficiais para o arrefecimento de alimentos confeccionados, conforme Tabela 5.

Tabela 5 – Requisitos para arrefecimento rápido de alimentos confeccionados na Europa (Evans *et al.*, 1996)

Estado-Membro	Intervalo de Temperaturas (°C)	Tempo máximo permitido (horas)	Temperatura subsequente (°C)
Dinamarca	65 para 2	3	< 5
França	70 para 10	2	0 – 3
Alemanha	80 para 15	2	---
	15 para 2	24	< 2
Suécia	80 para 8	4	< 3
Reino Unido	70 para 3	1,5	0 – 3

Relativamente ao armazenamento em refrigeração, certos estudos demonstram que a multiplicação e a produção de toxinas são insignificantes em cinco dias de armazenamento a temperaturas inferiores a 3°C (Sprenger, 2002), mas de acordo com Gould (1996), o armazenamento do produto a temperaturas inferiores a 3°C pode prolongar-se até 3 semanas, podendo surgir por vezes alterações devidas ao crescimento lento de microrganismos psicrotróficos, nomeadamente *Bacillus* e *Clostridium*. Também não deverá ser negligenciada a possibilidade de desenvolvimento de outros microrganismos patogénicos que suportem baixas temperaturas, como *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* (Sprenger, 2002)

e também de *C. perfringens* e de *C. botulinum* proteolítico, bastando que ocorra uma falha significativa na temperatura de armazenamento (Rybka-Rodgers, 2001).

Nas refeições “cook-chill” pode ocorrer crescimento de esporos de qualquer microrganismo patogénico que sobreviva à cocção ou através da recontaminação durante o arrefecimento e/ ou armazenamento. A 3°C a fase log da maioria das bactérias patogénicas psicrotróficas não produtoras de esporos, tal como *L. monocytogenes*, é cerca de uma semana com 20 horas de tempo de geração posterior (Mossel & Struijk, 1991, citados por Rybka-Rodgers, 2001). Consequentemente, um produto contaminado com 10 UFC/ g de *L. monocytogenes* pode acumular 10³ UFC/ g em 2 semanas de armazenamento, o que constitui a dose infecciosa em indivíduos imunocompetentes (Sutherland e Porritt, 1997, citados por Rybka-Rodgers, 2001).

Porém, a maioria dos microrganismos psicrotróficos deverá ser destruída durante o processo de regeneração (Sprenger, 2002). Esta etapa deverá garantir que a temperatura no centro térmico do alimento é de, pelo menos 70°C (Doyle, 2002). Esta temperatura será suficiente para eliminar a maioria dos microrganismos patogénicos; contudo, não eliminará toxinas bacterianas, como as produzidas por *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* ou por *Bacillus cereus*, nem esporos bacterianos (Doyle, 2002).

Como tal, as boas práticas de higiene, a destruição pelo calor de microrganismos patogénicos (formas vegetativas) com a confecção, o armazenamento a baixas temperaturas e uma vida útil de curta duração são factores de garantia da qualidade dos alimentos “cook-chill”.

3.2.3.2 O método “cook-freeze”

O método “cook-freeze” é em tudo semelhante ao método “cook-chill”, no entanto, alguns parâmetros processuais são diferentes.

Como é possível verificar na Figura 2, as primeiras etapas do método “cook-freeze” são as mesmas do método “cook-chill”, nomeadamente: recepção e armazenamento das matérias-primas, preparação e confecção, mas a quinta etapa é a ultracongelação. Neste caso, pretende-se a redução da temperatura das refeições a -18°C em menos de 90 minutos (Fennema *et al.*, 1973, Brown, 2006). A ultracongelação evita a formação de cristais de gelo de grandes dimensões, que

alteram a textura do alimento e conduzem a perdas nutricionais durante a regeneração (Sprenger, 2002). O ponto inicial de congelação da maioria dos alimentos encontra-se entre $-0,5^{\circ}\text{C}$ e $-2,8^{\circ}\text{C}$ (Fennema *et al.*, 1973).

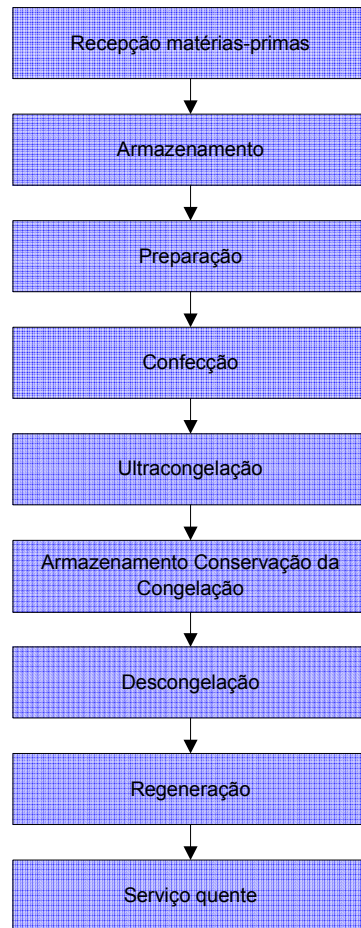


Figura 2 – Fluxograma do método “cook-freeze”

Geralmente, ocorre um decréscimo de 20 a 90% dos microrganismos inicialmente presentes com a ultracongelação, mas uma vez que ocorra a descongelação, os microrganismos remanescentes retomarão de imediato a sua actividade (Taoukis & Labuza, 1989).

Após a ultracongelação, o alimento poderá ser conservado entre -18°C e -20°C até 12 meses. Uma vez que a temperaturas inferiores a -18°C não existe desenvolvimento microbiano, essa temperatura é, em muitos países, especificada para a conservação da congelação de alimentos ultracongelados. Porém, a permissão legal

de, em determinadas circunstâncias, sobretudo durante o transporte, os alimentos ultracongelados podem atingir temperaturas de -15°C , demonstra a impossibilidade prática de manutenção dos ultracongelados à temperatura constante de -18°C (Geiges, 1996).

Em vários estudos, ficou demonstrado que não é possível armazenar alimentos durante períodos prolongados, a temperaturas próximas às do limite inferior de crescimento dos microrganismos (Taoukis & Labuza, 1989). Actualmente sabe-se que a temperatura mais baixa para multiplicação de algumas bactérias nos alimentos é de -5°C a -8°C (Geiges & Schuler, 1988, Schmidt-Lorenz, 1963, Schmidt-Lorenz & Gutschmidt, 1968, citados por Geiges, 1996). Na maioria dos estudos desenvolvidos por Geiges (1996), foi observado um aumento médio nas contagens de microrganismos aeróbios totais de aproximadamente 3 log durante 1 ano a $-7,5^{\circ}\text{C}$, enquanto que a uma temperatura de -10°C , no mesmo intervalo de tempo, após um decréscimo intermédio típico no número de unidades formadoras de colónias, apenas se obteve um número de microrganismos idêntico ao inicial. Pode, portanto, inferir-se que a temperatura mais baixa à qual ocorre crescimento bacteriano é de -8°C . Os mesmos autores, observaram que o limite inferior de reprodução das leveduras era de -10°C e valores semelhantes foram observados para bolores (Geiges, 1996). Os alimentos conservados a estas temperaturas revelaram sinais de deterioração evidentes que, independentemente do desenvolvimento microbiano, estão associados à actividade enzimática.

Um aumento de temperatura, como o que ocorre quando os alimentos ultracongelados são transferidos de uma unidade de frio para outra (entre o produtor e o retalhista, ou entre o retalhista e o consumidor), é insuficiente para o desenvolvimento dos microrganismos (Geiges, 1996). Por outro lado, os equipamentos utilizados para a exposição de ultracongelados, sobretudo os abertos e com sistema de descongelação automático, ao efectuarem dois ciclos diários de descongelação do evaporador, permitem que a temperatura superficial dos produtos atinja valores próximos dos 0°C . Nestas condições de grande amplitude térmica, os microrganismos saprófitas podem desenvolver-se (Geiges, 1996).

Antes da regeneração, o alimento deverá ser completamente descongelado, isto é, não deverão existir cristais de gelo no alimento. Após a descongelação, o alimento poderá ser regenerado do mesmo modo do que um alimento “cook-chill” (Brown, 2006). Contudo, se a descongelação não ocorrer na totalidade, certas áreas do alimento continuam congeladas e na regeneração, a temperatura nestas zonas do

alimento poderá não ser suficiente para a destruição de microrganismos patogênicos que possam eventualmente existir (Barrie, 1996 citado por Brown, 2006).

Nas etapas da ultracongelação, conservação de congelados e descongelação, ocorre morte ou inativação de alguns dos microrganismos presentes. Apesar de existirem muitos estudos sobre esta questão, os resultados são contraditórios e surgiram diferentes teorias sobre a razão da ocorrência de morte ou inativação microbiana. Segundo Baust (1968), citado por Geiges (1996), as principais razões são:

1. Dano mecânico na parede ou membrana celular devido à formação de gelo intra ou extra-celular.
2. Inexistência de equilíbrio electrolítico, devido a desidratação e aumento da concentração de solutos devido à formação de cristais de gelo, o que origina perda de água de superfície, conduzindo à desnaturação proteica. Outra possibilidade é a redução da distância entre proteínas individuais seguida da formação de pontes dissulfido anormais.
3. Redução do volume celular abaixo de um limite crítico, o que conduz a rotura da membrana.

Uma outra teoria sugere que o dano não é devido à congelação inicial, mas ao fenómeno da “recristalização”, pelo qual tem lugar a formação de cristais de grande dimensão.

Estas teorias ainda não foram suficientemente investigadas, mas pode assumir-se que pelo menos uma influencia o processo de morte ou inativação microbiana, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6 – Factores que influenciam o comportamento dos microrganismos durante a conservação da congelação (adaptado de Geiges, 1996)

1.	Velocidade da congelação
2.	Temperatura do armazenamento
3.	Tempo de armazenamento
4.	Características do alimento: composição (gordura, sais, hidratos de carbono, proteína); a_w ; pH;
5.	Microflora: composição; número de microrganismos, fase de crescimento
6.	Tipo de embalagem
7.	Velocidade e temperatura de descongelação

A velocidade da congelação e da descongelação influencia o número de microrganismos que sobrevivem. A congelação rápida é altamente recomendável por questões ligadas à qualidade do produto (Geiges, 1996). De acordo com Lorentzen (1978), citado por Geiges (1996), os tempos de congelação e de descongelação dependem da redução da entalpia, espessura, geometria, embalagem, coeficiente de transferência de calor da superfície e temperatura do meio onde é efectuada a congelação. De acordo com Schmidt-Lorenz (1970), citado por Geiges (1996), o tempo e a temperatura de armazenamento são os factores mais importantes. O armazenamento entre -10º e 0ºC conduz a uma morte microbiana mais ou menos rápida. A temperaturas abaixo dos -30ºC, o número de microrganismos permanece virtualmente constante durante o armazenamento. Alimentos com uma viscosidade elevada e ricos em proteína, hidratos de carbono e gordura conferem uma maior protecção aos microrganismos. As substâncias que reduzem a tensão de superfície também aceleram a morte microbiana (Geiges, 1996).

Relativamente à flora microbiana, os dados experimentais não fornecem uma ideia quantitativa e qualitativa muito uniforme. Aparentemente, não existe uma tendência universal. A flora bacteriana dos alimentos armazenados entre 0º e -10ºC depende da composição da flora inicial, que é função de cada alimento. A maioria dos estudos citados por Geiges (1996) menciona como espécie bacteriana mais comum a *Pseudomonas* spp. Os esporos de *Bacillus* spp. e de *Clostridium* spp. são os que demonstram maior resistência a baixas temperaturas. As células vegetativas de micrococos, estafilococos e estreptococos, em particular *E. faecalis*, são muito resistentes durante o armazenamento a baixas temperaturas. De um modo geral, as bactérias gram-negativas são geralmente mais sensíveis à congelação do que as gram-positivas. Segundo Geiges (1996), as bactérias na fase log de crescimento são mais sensíveis à congelação do que as que se encontram na fase estacionária. Geralmente, as *Enterobacteriaceae* não conseguem crescer a baixas temperaturas.

3.2.3.3 Tecnologia de barreiras

No sentido lato da expressão, a conservação de alimentos refere-se a todas as medidas que visam evitar qualquer deterioração dos alimentos. No sentido estrito, no entanto, a conservação de alimentos refere-se a processos específicos que evitam a deterioração dos alimentos devido à acção microbiana ou a fenómenos bioquímicos.

As tecnologias de conservação alimentar procuram sobretudo a inactivação microbiana ou a protelação e prevenção do crescimento microbiano e, por conseguinte, devem actuar sobre os factores que mais eficazmente influenciam a sobrevivência e o crescimento microbiano (Lee, 2004).

A maioria dos alimentos perderia qualidade organoléptica se submetida a 121°C durante 3 minutos (binómio de destruição de *C. botulinum*) (Rybka-Rodgers, 2001). Por outro lado, e de acordo com Geiges (1996), as falhas na cadeia do frio são ainda muito comuns, pelo que é necessário que o método utilizado para a conservação de alimentos possua mais do que um factor de controlo (Rybka-Rodgers, 2001).

Os factores utilizados para a conservação dos alimentos são chamados obstáculos ou barreiras e podem assumir natureza física, físico-química, microbiana ou mista (Lee, 2004).

A tecnologia de barreiras (“Hurdle technology”) defende a combinação propositada de técnicas de conservação, existentes ou emergentes, que actuam como barreiras ou obstáculos à presença e/ou desenvolvimento de microrganismos (Leistner & Gorris, 1995).

Nas últimas décadas, o conceito de combinar várias técnicas de conservação foi desenvolvido por Leistner (Leistner & Gorris, 1995). O aparecimento da tecnologia de barreiras é o resultado de uma série de desenvolvimentos técnicos e comerciais, mas de acordo com Lee (2004), os mais importantes foram o aumento da procura de alimentos mais naturais, que retenham as suas propriedades nutricionais e com menos conservantes, assim como o aumento da procura por refeições prontas a consumir, que exigem pouco processamento por parte dos consumidores.

A tecnologia de barreiras permite combinar uma série de técnicas de conservação suaves de modo a alcançar um maior nível de segurança e estabilidade dos produtos (Lee, 2004).

A tecnologia de barreiras vem sendo desenvolvida há já vários anos, com base no estudo da sinergia e do antagonismo entre os factores extrínsecos e intrínsecos

que afectam a sobrevivência dos microrganismos nos alimentos (Leistner & Gorris, 1995). O conceito defende que a utilização de combinações de diferentes factores de conservação (ou barreiras) terá uma maior eficácia na inactivação microbiana do que a utilização de um único factor (Lee, 2004).

O facto de a estabilidade microbiana ser afectada por uma combinação de factores de conservação já é conhecido há muito tempo e o conceito tem sido usado de forma mais ou menos inconsciente em alimentos tradicionais. Nos produtos fumados, por exemplo, a combinação de barreiras inclui o tratamento térmico, a deposição de substâncias antimicrobianas pelo fumo sobre a superfície do alimento e o reduzido valor de a_w . Alguns alimentos fumados também podem ser mergulhados ou embebidos em salmoura ou friccionados com sal antes do fumeiro, para impregnar a carne com sal e, assim, adicionar um novo factor de conservação. Em compotas e outros doces de fruta, a combinação de factores resulta na aplicação do calor, reduzida a_w e elevada acidez (Leistner & Gorris, 1995, Lee, 2004).

Apesar de utilizados há já muitos séculos, só recentemente, os princípios subjacentes a estes métodos tradicionais de conservação de alimentos foram definidos (Lee, 2004).

Até agora, foram identificadas aproximadamente 50 barreiras diferentes para a conservação de alimentos. As mais usadas são as altas e baixas temperaturas, baixa a_w , baixo pH, baixo potencial redox, adição de flora competitiva e substâncias conservantes. (Leistner & Gorris, 1995).

Na actualidade, a tecnologia de barreiras têm sofrido aperfeiçoamentos e é já aplicável a uma vasta gama de alimentos, incluindo, hortofrutícolas, produtos de padaria, lacticínios, pescado e produtos cárneos (Leistner & Gorris, 1995).

Recentemente, cerca de 50 outras barreiras começaram a ser utilizadas na conservação de alimentos, como a ultra-pressão, mano-termo-sonicação, inactivação fotodinâmica, embalagem em atmosfera modificada, revestimentos comestíveis, etanol e bacteriocinas (Lee, 2004).

Na tecnologia de barreiras, as barreiras individuais, devido ao seu efeito combinado, e por vezes sinérgico, podem ter uma menor intensidade do que aquela que seria necessária se se tratasse de uma única barreira a ser aplicada no processamento do alimento. As barreiras individuais poderão ser aplicadas sequencialmente ou simultaneamente, dependendo do tipo de barreira e do processamento global do alimento. Este conceito revelou-se bem sucedido, uma vez que uma combinação apropriada de barreiras garante inactivação microbiana e, logo, segurança (Leistner & Gorris, 1995).

Um importante fenómeno que é crucial para a tecnologia de barreiras é a homeostase microbiana, que é a tendência constante para a manutenção da estabilidade e equilíbrio interno microbiano. Os factores de conservação podem perturbar um ou vários mecanismos de homeostase e, como resultado, os microrganismos não se multiplicarão, permanecendo inactivos, ou acabando mesmo por morrer (Leistner & Gorris, 1995).

De facto, a conservação dos alimentos é conseguida através da perturbação da homeostase microbiana, de modo temporário ou permanente, e uma das melhores formas de o conseguir é perturbar simultaneamente vários dos mecanismos homeostáticos. Isto significa que quaisquer barreiras aplicadas a um alimento devem afectar os microrganismos de diversas formas, como por exemplo, desestabilizando a membrana celular, afectando o DNA e determinadas enzimas, alterando o pH, etc. Esta abordagem multifacetada é a essência da tecnologia de barreiras (Leistner & Gorris, 1995).

O objectivo inicial do uso de barreiras combinadas no processamento de alimentos foi a obtenção de produtos seguros e estáveis, utilizando um tratamento tão ligeiro quanto possível. Porém, o conceito de tecnologia de barreiras também poderá contribuir para a melhoria da qualidade organoléptica dos alimentos (Leistner & Gorris, 1995).

O efeito das barreiras na qualidade dos alimentos pode ser positivo ou negativo, dependendo da sua intensidade. Algumas barreiras (por exemplo, a cura da carne) possuem propriedades antimicrobianas e, ao mesmo tempo, melhoram o sabor dos produtos. No entanto, alguns barreiras podem actuar negativamente sobre a qualidade do alimento. A título de exemplo, alguns vegetais refrigerados a temperaturas muito baixas poderão sofrer lesões tecidulares (queimaduras), enquanto que a manutenção dos mesmos produtos a temperaturas moderadas poderá ser benéfica para o prazo de validade (Lee, 2004).

3.2.3.4 Tecnologia de barreiras aplicada ao método “cook-chill”

De acordo com Rybka-Rodgers (2001), nos primeiros estudos conduzidos para destruir microrganismos produtores de esporos, o alimento, após cocção, foi arrefecido a 20°C para estimular a germinação dos esporos, mantido à temperatura ambiente durante 4 horas e pasteurizado a 85° ou 90°C para destruição de células vegetativas esporuladas. Este duplo tratamento térmico conduziu a uma perda inevitável de

qualidade organoléptica do alimento. Desde então, uma série de outras tecnologias de barreira têm sido aplicadas aos alimentos “cook-chill”, tal como é possível ver na Tabela 7. Estão classificadas em tecnologias físicas, químicas e biológicas.

Tabela 7 – Tecnologias de barreira aplicáveis a refeições “cook-chill” (Rybka-Rodgers, 2001)

Tecnologia de barreira	Vantagem	Desvantagem
<i>Física</i>		
Aquecimento adicional	Alimentos “efectivamente estéreis”	Qualidade inferior
Irradiação	Possibilidade de tratamento dentro da embalagem	Resistência do consumidor; custos; embalagem especial
	Perda de nutrientes pouco expressiva	
Embalagem em atmosfera modificada	Inibição da oxidação e da alteração microbiana	Sem efeito nos patogénicos
Pressão hidrostática	Possibilidade de tratamento dentro da embalagem	Resistência dos esporulados, possível efeito na estrutura do alimento.
<i>Química</i>		
Reguladores de pH, sais e especiarias	Baixo custo	Efeito nas características sensoriais e nos requisitos nutricionais
Lactato	Termo-estável; eficaz contra os microrganismos produtores de esporos (incluindo o <i>C. botulinum</i>)	Afecta as características sensoriais Não inibe <i>B. cereus</i>
<i>Biológicas</i>		
Bacteriocinas	A maioria é termo-estável; eficaz contra os microrganismos produtores de esporos (incluindo o <i>C. botulinum</i>)	Desenvolvimento de resistências por alguns patogénicos; efeito inibitório inconsistente; decomposição durante o armazenamento
Culturas protectoras	Sensíveis a alterações de temperatura; eficaz contra os microrganismos produtores de esporos (incluindo o <i>C. botulinum</i>); efeito probiótico potencial	Custo e manipulação das culturas; termo-sensíveis

3.2.4 Evolução das tecnologias de conservação de alimentos

Conforme referido anteriormente, a venda a retalho de refeições prontas-a-consumir está a aumentar, devido à conveniência e à ideia de frescura que lhes está associada.

São muitas as vantagens apontadas aos métodos “cook-chill” e “cook-freeze”, sendo a poupança de recursos a mais referida; esta poupança advém da redução dos custos energéticos, devido à optimização da utilização dos equipamentos, necessidade de menos mão-de-obra e redução dos picos de volume de trabalho (Sprenger, 2002). Contudo, segundo a Food Safety Authority of Ireland (2006) a aplicação destes métodos não tem sido fácil. A Tabela 8 indica algumas das questões a considerar antes da implementação destes métodos numa indústria alimentar.

Tabela 8 - Questões a considerar antes de implementar o método “cook-chill”/ “cook-freeze” (Food Safety Authority of Ireland, 2006)

-
1. Quantidade de alimentos “cook-chill” a preparar
 2. Consumidor final dos alimentos “cook-chill”
 3. Formação do pessoal afecto em Qualidade, higiene e segurança alimentar
 4. Adequabilidade das instalações para receber o método “cook-chill”
 5. Disposição da zona de preparação e das restantes instalações
 6. Equipamento adequado
 7. Requisitos de distribuição e transporte
 8. Custo financeiro
-

Para além da poupança de recursos, são também indicadas como vantagens destes métodos, a melhoria das condições e dos horários de trabalho, com a concomitante redução da rotatividade do pessoal, aumento da satisfação do cliente, pois as encomendas são satisfeitas num curto prazo e observa-se também uma melhoria da palatibilidade das refeições, quando comparadas com as que sofrem apenas manutenção quente a temperaturas superiores a 63°C, durante longos períodos (Sprenger, 2002).

Os métodos “cook-chill” e “cook-freeze” são mais seguros do que outros métodos convencionais de fabrico de refeições. Tal facto deve-se à redução dos picos de volume de trabalho, o que reduz a ocorrência de erro humano (Sprenger, 2002).

Porém, a falta de aperfeiçoamento desta tecnologia nos pequenos produtores, a pressão comercial e logística para aumentar a vida útil dos produtos, a necessidade

de uma distribuição refrigerada e o eventual desrespeito pela cadeia do frio por parte do consumidor contribuem para potenciais falhas na segurança destes produtos (Rodgers, 2004). Adicionalmente, esta tecnologia ainda possui algumas problemas práticos, nomeadamente: a exposição dos produtos a temperatura abusiva nos canais de distribuição, o facto de o armazenamento a temperaturas iguais ou inferiores a 3°C ser dispendioso, o facto de nem todos os parâmetros processuais possuírem uma justificação teórica aceitável e a existência de numerosas barreiras técnicas e dificuldades práticas na implementação do HACCP pelas empresas do sector alimentar (Rybka-Rodgers, 2001).

Para além disso, a redução do risco esbate-se, pelo menos estatisticamente, pela produção em larga escala, pois quanto maior a quantidade de alimentos produzidos, maior deverá ser o controlo sobre as operações, de forma a, pelo menos, manter o risco estatístico de toxinfecção alimentar. Também a ideia de que a confecção mata os microrganismos não se aplica a estes métodos. O processo deverá ser entendido como um factor de redução da carga microbiana, pois sempre que a qualidade higiénica das matérias-primas for fraca, os referidos métodos não poderão garantir alimentos de qualidade higiénica aceitável.

3.3 ESTUDOS DE VIDA ÚTIL DE ALIMENTOS

3.3.1 O conceito de vida útil de um alimento

De acordo com o Institute of Food Safety and Technology (2007), a vida útil de um alimento é “o tempo durante o qual um alimento é seguro, mantém as características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas e cumpre com qualquer alegação nutricional, que figure na respectiva rotulagem, quando armazenado nas condições recomendadas”. Já o *Codex Alimentarius*, define vida útil de um alimento como “o período durante o qual um alimento conserva a sua segurança microbiológica, a uma dada temperatura de armazenamento” (Food Safety Authority of Ireland, 2005). E a New Zealand Food Safety Authority (2005), considera que a vida útil de um alimento é uma indicação para o consumidor sobre o período de tempo durante o qual um alimento pode ser conservado antes que se comece a deteriorar, desde que tenham sido cumpridas as condições de conservação.

De acordo com Ledauphin *et al.* (2006), a vida útil de um alimento é normalmente determinada pela análise da degradação e decomposição microbiana

como função do tempo, condições de armazenamento e do tratamento que o alimento sofreu. A vida útil de um alimento tem início quando esse alimento é preparado e a sua duração depende de muitos factores, incluindo o tipo de ingredientes, processo produtivo, tipo de embalagem e condições de conservação (New Zealand Food Safety Authority, 2005).

No estudo de vida útil, para além das análises microbiológicas, deverá ser desenvolvida uma monitorização das características sensoriais do alimento. De facto, um alimento pode ser microbiologicamente seguro após algum tempo de armazenamento, mas ser rejeitado pelo consumidor devido a alterações nas suas propriedades sensoriais e nutricionais (Hough *et al.*, 2003).

Contudo, como os mecanismos de alteração dos alimentos são complexos e o consumidor tem uma sensibilidade variável a essa alteração, é impossível estabelecer uma definição universal de vida útil de um alimento (Ledauphin *et al.*, 2006).

3.3.1.1 Factores que influenciam a vida útil de um alimento

De um modo geral, podem identificar-se dois grandes tipos de factores que influenciam a vida útil dos alimentos:

a) Crescimento microbiano; o tempo necessário para que os microrganismos degradem os alimentos depende da quantidade inicial de microrganismos presentes no alimento, bem como da contaminação adicional que o alimento pode sofrer durante o embalamento e armazenamento (Mekalanos, 1992, Rodgers, 2004).

b) Factores não microbianos; existem muitas formas de alteração da qualidade dos alimentos que podem não resultar na perda de segurança de um produto, mas antes indicar que este deixou de satisfazer determinados requisitos (Food Safety Authority of Ireland, 2006). Como exemplo refere-se a alteração no teor de humidade de um alimento que induz perda de nutrientes, escurecimento ou rancificação; no caso dos alimentos secos, um acréscimo no teor de humidade conduz a um aumento na vulnerabilidade à acção microbiana (Li, 1999, Fan *et al.*, 2003)

A degradação química pode resultar numa alteração do cheiro ou do sabor do alimento, assim como à alteração da cor, escurecimento ou perda de nutrientes (Li, 1999).

A exposição à luz pode induzir rancificação, perda vitamínica e perda de cor ao alimento a ela sujeito (Li *et al.*, 1999, Fan *et al.*, 2003).

O dano físico da embalagem dum alimento pode resultar em alteração do alimento, o que o torna vulnerável devido à falta de protecção (Gould, 1996).

3.3.2 Definição de estudo de vida útil de alimentos

De um modo muito simplista, o estudo de vida útil de um alimento consiste em armazenar amostras desse alimento, em condições semelhantes às reais e submetê-las a uma série de análises a intervalos de tempo pré-determinados, até ao limite de aceitação (Labuza & Fu, 1997).

Um estudo de vida útil é uma determinação objectiva e metódica do período de conservação razoavelmente expectável para um determinado alimento, durante o qual não é apreciável qualquer alteração na sua qualidade (Rybka-Rodgers, 2001).

Durante esse período de tempo, são observadas as alterações sofridas pelo alimento e determina-se o tempo que este leva para se alterar/ deteriorar até ao limite que o torna impróprio para o consumo (Corradini *et al.*, 2007).

A identificação e a definição quantitativa dos atributos que se alteram constituem uma forma de monitorizar a perda de características durante o armazenamento (Hough, 2006).

3.3.3 A crescente necessidade dos estudos de vida útil

Na década de 1990, aumentou a procura de alimentos com um maior tempo de vida útil. Na génese de tal facto está o aumento da procura por alimentos frescos, práticos, seguros e de qualidade superior durante todo o ano e a globalização dos sistemas de distribuição alimentar, que por sua vez pressionaram a indústria alimentar a assegurar a estabilidade e o tempo de armazenagem dos alimentos, que são comercializados cada vez mais longe do local de produção (Labuza, 2000).

Para a indústria alimentar assegurar a exigência de produtos com vida útil prolongada e, simultaneamente, minimamente processados, deverá desenvolver métodos de conservação melhorados, melhorar as características organolépticas e promover a formação de técnicos especialistas em análise alimentar (Labuza, 2000).

O estudo da conservação dos alimentos não produz resultados unívocos e absolutos, de aplicação directa a todos os alimentos, pois estes possuem grande variedade e complexidade e estão em constante alteração (Fu & Labuza, 2000). Para

conhecer a vida útil expectável de um alimento, dever-se-á conhecer as alterações microbiológicas, enzimáticas e físico-químicas que ocorrem nesse alimento, identificando os mecanismos responsáveis pela perda de características organolépticas ou nutrientes desejáveis e implementando modelos analíticos que estimem o período durante o qual o alimento mantém uma qualidade aceitável para ser consumido, do ponto de vista organoléptico e higiénico (Labuza, 2000).

Deste modo, consideram-se quatro factores críticos na determinação da vida útil de um alimento: formulação, processamento, embalagem e condições de armazenamento, e o seu impacto relativo depende da perecibilidade do alimento (Labuza, 2000). Na formulação considera-se a selecção das matérias-primas mais apropriadas de forma a garantir a segurança e integridade do produto final durante a sua vida útil; como factores-chave na vida útil consideram-se a a_w , o pH e a junção de conservantes e anti-oxidantes. O processamento expõe as matérias-primas a condições desfavoráveis à ocorrência de reacções de deterioração, mas promove alterações físicas e químicas desejáveis, conferindo ao alimento as suas características.

Uma vez terminada a etapa do processamento, a capacidade do alimento conservar as suas propriedades é função do ambiente existente na embalagem e das condições de armazenagem, pelo que, poderão ser parâmetros importantes na determinação da vida útil a composição do gás (oxigénio, dióxido de carbono, gases inertes, etileno, etc.), a humidade relativa, a pressão ou stresse mecânico, a exposição à luz e a temperatura (Labuza, 2000).

3.3.4 Delineamento do estudo de vida útil

O estudo da vida útil de um alimento pode seguir vários métodos, incluindo o cálculo com base em dados publicados, uso de tempos de distribuição conhecidos para produtos similares já colocados no mercado ou uso das reclamações do consumidor como base para determinar a ocorrência de problemas. Estes métodos têm várias contra-indicações, incluindo o facto de, normalmente, os dados da análise de vida útil serem sigilosos, não existirem produtos iguais no mercado ou não existir qualquer informação/ reclamação do consumidor sobre o produto em causa (Corradini *et al.*, 2007).

Qualquer estudo de vida útil procura responder a duas questões: “Qual a vida útil do produto?” e “Será que o produto mantém uma qualidade aceitável no momento do consumo?”. A selecção de uma abordagem apropriada e segura para delinear a

perda de qualidade de um alimento é a etapa mais importante no estudo de vida útil e conduz ao desenho eficaz de testes de vida útil (Hough, 2006).

A Tabela 9 resume as principais questões a definir antes de iniciar a análise de vida útil de um alimento.

Tabela 9 – Questões a considerar no início do estudo de vida útil de um alimento (adaptado de Hough, 2006)

Questões a considerar antes do estudo de vida útil de um alimento	
a)	O que se conhece sobre o alimento (composição, processo, equipamento)?
b)	O alimento é uma variante de outro já existente? Se sim, o que foi alterado?
c)	Existe algum produto concorrente muito similar?
d)	É microbiologicamente estável?
e)	Já foi seleccionado o sistema de embalagem?
f)	Qual a vida útil esperada?
g)	Que quantidade pode ser produzida no momento presente?
h)	Qual o orçamento disponível?

Conclui-se que a vida útil de um alimento é, em grande parte, determinada pela sua composição, tipo de processamento, atributos iniciais, embalagem e temperatura de conservação (e, eventualmente, temperatura do transporte).

Um delineamento experimental mal conduzido leva a conclusões incorrectas acerca da vida útil do alimento (Hough, 2006, Labuza, 2000).

3.3.5 Aplicação de uma margem de segurança à vida útil

A reprodutibilidade e a confiança na vida útil determinada para um dado produto é afectada pelas propriedades intrínsecas e extrínsecas desse mesmo produto. Contudo, é pouco realista esperar que a vida útil de um alimento seja 100% reprodutível em diferentes circunstâncias (Taoukis *et al.*, 1989). Adicionalmente, a vida útil nunca é um valor absoluto, que termina num tempo e data exacta. Será mais correcto considerá-la uma distribuição de tempos e datas em torno de uma vida útil média (Labuza, 2000).

Portanto, a aplicação de uma margem temporal de segurança à vida útil de um dado alimento é muito importante, apesar de implicar uma redução da sua durabilidade, permitindo ao produtor ter em conta qualquer variação expectável, ou

não, das condições de produção, armazenamento, distribuição e consumo (Food Safety Authority of Ireland, 2005, New Zealand Food Safety Authority, 2005).

3.3.6 Indicadores nas análises de vida útil

Conforme referido anteriormente, a vida útil de um alimento pode ser definida como o período durante o qual um alimento conserva a sua segurança, a uma dada temperatura de armazenamento (*Codex Alimentarius Commission*, 1999).

Para uma abordagem segura nos estudos de vida útil, é necessário definir indicadores que meçam, ou correspondam, directamente à qualidade de um alimento (Labuza, 2000).

Esses indicadores incluem avaliação microbiológica, sensorial e físico-química (Labuza, 2000).

3.3.6.1 Avaliação sensorial nos estudos de vida útil de alimentos

A avaliação sensorial é primordial na determinação da vida útil de muitos géneros alimentícios.

A avaliação sensorial tem diferentes abordagens, consoante se trate da avaliação de um produto industrial ou de um produto tradicional. Isto deve-se ao facto do consumidor actual considerar inaceitável qualquer diferença num alimento industrial, em qualquer fase da sua vida útil, mas em alimentos tradicionais aplica-se o conceito “diferente, mas aceitável” (Hough, 2006). Estes factos influenciam o tipo de metodologia a seguir.

Assim, algumas fragilidades e questões são levantadas por Hough (2006) às análises de vida útil, sobretudo às sensoriais; em que momento da vida útil são os alimentos realmente consumidos? Quão seguras são as previsões baseadas em estudos laboratoriais, nos quais painéis de provadores treinados ou consumidores provam pequenas porções de um alimento em condições controladas? O que acontece à vida útil de um alimento assim que é aberta a respectiva embalagem? No fim da vida útil, o alimento deverá ser igual ao que era quando processado ou diferente, mas aceitável?

De acordo com Fan, X., Niemira, B., e Sokorai, K. (2003), do ponto de vista sensorial, a vida útil de um alimento não depende exclusivamente dele, mas antes da

interacção que se estabelece entre o alimento e o seu consumidor. Os referidos autores constataram que, sendo a vida útil de cebolas irradiadas 9 dias e sendo o dia 6 o limite para a respectiva comercialização, alguns consumidores ainda adquiririam as cebolas no dia 9, enquanto outros as rejeitariam logo no dia 6.

Deste modo, Garitta *et al.* (2005) consideram que do ponto de vista sensorial, a atenção não deverá recair exclusivamente sobre a deterioração do produto, mas também sobre a rejeição do produto pelo consumidor.

Segundo Labuza (2000), a avaliação sensorial efectuada por um painel de provadores treinado costuma dar uma boa noção das características do alimento.

A avaliação sensorial possui pelo menos dois tipos de abordagem: os testes de diferença, em que se tenta determinar, com determinado grau de probabilidade, se um alimento sofreu alteração, sendo que apenas se determina o momento em que houve alteração e não o comportamento das características ao longo do tempo; por outro lado, os testes hedónicos procuram modelar a perda progressiva das características do alimento, usando uma escala graduada. Contudo, os requisitos relativos à uniformidade, experiência e tamanho do painel são mais exigentes nos testes hedónicos do que os relativos aos testes de diferença e, se não forem satisfeitos, originam dados pouco credíveis (Labuza, 2000). Ainda assim, como ambos os tipos de testes sensoriais são muito variáveis, a obtenção de resultados válidos é difícil. Portanto, as avaliações sensoriais típicas com testes hedónicos e de diferença não conseguem oferecer uma visão precisa da vida útil de um dado produto (Labuza, 2000), o que talvez explique que, de um modo geral, não se realize este tipo de testes na indústria alimentar (Food Safety Authority of Ireland, 2005). Segundo Hough (2006), a não realização de testes sensoriais por parte da indústria alimentar também pode ficar a dever-se ao facto do painel de provadores ter de ser reunido repetidamente no fim de cada intervalo de tempo de armazenagem, pois se o painel for constituído por consumidores, os custos associados são muito elevados. Se o painel for constituído por provadores treinados, a principal dificuldade será manter uma performance regular ao longo de todo o estudo, pois os provadores aperceber-se-ão que estão a efectuar um estudo de vida útil, o que condicionará a ocorrência de erros, relacionados com expectativa (Hough, 2006).

3.3.6.1.2 O método "Weibull Hazard"

Enquanto que existem diferentes abordagens estatísticas e gráficas para os dados sensoriais nos estudos de vida útil, este método gráfico de grande

verosimilhança tem atraído cada vez mais adeptos na indústria alimentar (Labuza, 2000).

Este método foi utilizado até há pouco tempo, de forma exclusiva, na indústria química e farmacêutica como uma boa aproximação da avaliação sensorial, utilizando a análise de perigos para responder à questão “O produto é aceitável?”. A frequência da avaliação é aumentada perto do fim expectável da vida útil, para que se determine com maior precisão a vida útil do alimento.

Neste método, avalia-se um determinado número de alimentos e, em seguida, determina-se o momento temporal a partir do qual cada unidade da amostra deixou de ser aceitável (Schmidt, 1992). Os dados da análise são convertidos em gráfico temporal, utilizando a distribuição Weibull para determinar o momento em que 50% dos consumidores consideram o produto inaceitável (Labuza, 2000).

Porém, este método ainda não é comumente utilizado na indústria alimentar (Schmidt, 1992). Segundo Labuza (2000), com algumas alterações poderá ser muito útil, sobretudo em indústrias alimentares de pequena dimensão, pois evita os custos associados à manutenção de um painel de provadores sofisticado.

3.3.6.2 Avaliação objectiva nos estudos de vida útil de alimentos

As análises microbiológicas e físico-químicas são amplamente usadas nos estudos de alimentos. Uma avaliação cuidada das reacções biológicas e químicas e das alterações físicas do alimento, tendo por base conhecimentos de ciência dos alimentos, permite reconhecer quais os mais importantes para a segurança, integridade e qualidade global do alimento. Os parâmetros microbiológicos e físico-químicos são usados na avaliação da qualidade dos alimentos e podem ser relacionados com os resultados da análise sensorial para estabelecer um limite de vida útil (Labuza, 2000 e Fu *et al.*, 2000).

3.3.6.2.1 Análise microbiológica

A qualidade microbiológica de um alimento é principalmente determinada pelo número de microrganismos presentes nesse alimento (Malakar *et al.*, 1999). Relativamente à análise microbiológica, o interesse recai em primeiro lugar nos agentes patogénicos, na flora de alteração e nas toxinas (Marth, 1998).

A identificação e contagem dos microrganismos envolvidos na deterioração dos alimentos é um método sensível, mas relativamente demorado (Almeida, 2006). Ainda assim, a análise microbiológica é um auxiliar precioso na determinação da frescura e previsão da vida útil de um alimento.

De acordo com Labuza (2000), o estatuto microbiológico de refeições refrigeradas com vida útil prolongada (refeições rápidas prontas a consumir e refeições completas para regenerar), é sobretudo influenciado pelos microrganismos psicrótrópicos e mesófilos, uma vez que possuem a capacidade de crescimento no caso de flutuações térmicas ou refrigeração prolongada. Nesses casos, e para estimar a vida útil do produto, seria importante determinar qual o potencial de crescimento dos microrganismos psicrótrópicos durante o armazenamento refrigerado, assim como estimar o impacto desse crescimento na qualidade organoléptica do produto (Marth, 1998).

Alguns dos microrganismos mais interessantes de analisar em refeições submetidas ao método “cook-chill” são *Listeria* spp., *Escherichia coli* enteropatogénica, *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*. Adicionalmente, alguns bolores, leveduras e bactérias psicrótróficas ácido-lácticas, *Pseudomonas* spp. e *Microbacterium* spp., podem crescer o suficiente para provocar alteração, mesmo em alimentos refrigerados (Labuza, 2000).

Quando é necessário determinar o crescimento de microrganismos de alteração, os métodos clássicos de análise são os mais utilizados (Labuza, 2000) e servem como instrumento na estimativa da validade de inúmeros alimentos (Almeida, 2006).

Nos métodos clássicos de análise microbiológica de alimentos, destacam-se a contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C e a contagem de *Enterobacteriaceae*, que constituem indicadores gerais de higiene do alimento, e a pesquisa e/ ou contagem de microrganismos patogénicos, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Contudo, estes métodos clássicos de análise microbiológica podem ser muito demorados, para além de serem exigentes do ponto de vista material.

Perante estas limitações, houve a necessidade de desenvolver métodos alternativos aos clássicos, comumente chamados métodos rápidos (Vasavada, 1997, Fung, 1998). Estes permitem o isolamento, detecção precoce, caracterização e enumeração de microrganismos e seus produtos, quer em alimentos quer do ambiente fabril (Almeida, 2006).

3.3.6.2.2 Análise físico-química

Muitas reacções químicas e bioquímicas determinam a degradação de qualidade dos alimentos como, por exemplo, a oxidação lípidica, a hidrólise proteica e dos polissacáridos, o escurecimento enzimático e não enzimático, dependendo do alimento em causa.

As determinações físico-químicas mais usuais incluem, entre outras, a análise centesimal e/ ou nutricional, a determinação do potencial hidrogeniónico, a determinação do índice do ácido tiobarbitúrico e a determinação do azoto básico volátil total.

3.3.7 Métodos de estudo da vida útil

Os principais métodos de estudo da vida útil são os directos e os indirectos. (New Zeland Food Safety Authority, 2005).

Os métodos directos são os mais comuns (Labuza, 2000) e implicam o armazenamento do alimento em condições previamente seleccionadas, durante um intervalo de tempo superior à vida útil expectável, no decurso do qual o alimento é verificado a intervalos regulares para determinar quando se inicia a sua alteração. O procedimento exacto é único para cada alimento.

Os métodos indirectos utilizam os estudos acelerados e/ou modelos de microbiologia predictiva (New Zeland Food Safety Authority, 2005).

3.3.7.1 Método directo

A primeira etapa do método directo para a determinação da vida útil de um alimento é a identificação das causas de degradação do alimento, como é possível verificar na Tabela 10.

Tabela 10 – As seis etapas utilizadas no método directo para a determinação da vida útil de alimentos (adaptado de New Zeland Food Safety Authority, 2005, Labuza & Fu, 1997)

Etapas do método directo para a determinação da vida útil de um alimento	
1.	Identificação das causas de degradação do alimento
2.	Seleccção dos ensaios a realizar
3.	Planeamento do estudo de vida útil
4.	Realização do estudo de vida útil
5.	Determinação da vida útil
6.	Monitorização da vida útil

De acordo com Fu & Labuza (2000), a degradação alimentar pode ser de dois tipos: degradação relacionada com o produto e degradação relacionada com o processo. No primeiro caso, deverão ser considerados factores tão variados como a utilização de matérias-primas cruas e sua interacção, actividade da água, pH, presença de gases, uso de aditivos; no caso da degradação relacionada com o processo interessa considerar o tipo de processamento, a embalagem e o seu armazenamento (New Zeland Food Safety Authority, 2005 e Fu & Labuza, 2000).

Posteriormente, e como segunda etapa, há que escolher os ensaios a utilizar e estes deverão ser adequados ao produto em estudo. Os critérios a aplicar são variáveis, no entanto, será sempre aconselhada a pesquisa de bactérias patogénicas associadas ao alimento (New Zeland Food Safety Authority, 2005 e Fu & Labuza, 2000).

Será também importante deter os registos de temperatura de armazenamento durante o período de estudo (New Zeland Food Safety Authority, 2005).

De um modo geral, os distinguem-se três tipos de ensaios:

a) avaliação microbiológica: destina-se a avaliar a segurança e qualidade microbiológica do alimento em estudo. Esta avaliação permite estimar alterações no número e tipo de microrganismos, ao longo do tempo. A identificação de microrganismos patogénicos reveste-se de especial importância (New Zeland Food Safety Authority, 2005).

b) avaliação sensorial: destina-se a monitorizar parâmetros organolépticos e a detectar alterações que ocorram ao longo do tempo de vida útil (Hough, 2003).

c) avaliação físico-química: destina-se a detectar alterações na qualidade do produto ao longo da sua vida útil. Inclui determinação do pH, determinação do azoto básico volátil total, análise da embalagem, testes de migração, análise do transporte, entre outros (New Zeland Food Safety Authority, 2005, Fu & Labuza, 2000).

Depois de seleccionados os ensaios a realizar, interessa planificar o estudo de vida útil. Segundo a New Zeland Food Safety Authority (2005), nesta etapa interessa definir:

- a) Tempo do estudo e frequência de realização dos diferentes ensaios,
- b) Número de amostras a analisar em cada ensaio,
- c) Número total de amostras,
- d) Início e fim do estudo.

A etapa seguinte é a realização do estudo de vida útil propriamente dito. Durante o estudo, as amostras deverão ser armazenadas em condições em tudo idênticas às da produção normal.

Uma vez estimada a vida útil do produto, considerando condições ideais de armazenamento, dever-se-á ter em conta as condições de armazenagem reais, sobretudo os presumíveis abusos de temperatura. (New Zeland Food Safety Authority, 2005, Rodgers, 2004).

A vida útil definida para o produto deverá ser a razoável, e não a ideal, e deverá incluir uma margem de segurança (Food Safety Authority of Ireland, 2005).

Após o primeiro estudo de vida útil, deverão seguir-se outros, os quais poderão conduzir a um reajustamento, pelo que é correcto falar-se de monitorização da vida útil (Rodgers, 2004). Os estudos de vida útil deverão ser repetidos sempre que ocorrerem modificações no processo ou no produto.

Também será importante investigar as reclamações dos consumidores, sobretudo as relacionadas com falhas do produto durante a vida útil, pois poderão conduzir à correcção de um problema recorrente ou ser indicativos da necessidade de reavaliar a vida útil (Labuza & Fu, 1997).

3.3.7.2 Métodos indirectos

Existem outros métodos, diferentes dos tradicionais, para determinar a vida útil de um alimento, sem efectuar testes demorados cuja duração é igual à vida útil efectiva do produto; como tal, poderão ser úteis para o estudo de produtos com uma longa vida de prateleira (New Zeland Food Safety Authority, 2005). Na realidade, as limitações de tempo no desenvolvimento de novos produtos alimentares impedem a prossecução de testes de vida útil em tempo real. Nesses casos consideram-se diferentes abordagens:

a) Dados bibliográficos: poder-se-á estimar a vida útil de um alimento com base nos dados publicados por entidades idóneas e internacionalmente reconhecidas. Mas, normalmente, estes dados são reduzidos e limitam-se a alguns alimentos (Labuza, 2000).

b) Tempo de comercialização (“distribution turn over”): nesta abordagem utiliza-se o tempo de vida útil de alimentos similares para estabelecer a vida útil do alimento em estudo. Apesar de arriscado, não exige tempo de análise, mas será importante ter uma ideia aproximada do tempo de armazenamento em casa do consumidor. Na eventualidade de não existir um produto similar, este método não poderá ser utilizado (Fu & Labuza, 2000).

c) Teste de distribuição (“distribution abuse test”): se o produto já é comercializado, ou se existir confiança suficiente no produto, este método é muito adequado. O alimento é recolhido no local de venda (normalmente, no supermercado) e é armazenado no laboratório em condições normais de armazenamento. É, portanto, um método que se baseia no tempo de distribuição e nas condições normais de armazenamento (Fu & Labuza, 2000).

d) Insatisfação do consumidor: outro método de determinação da vida útil de alimentos que não requer estudos iniciais é baseado na utilização das queixas e reclamações do consumidor para determinar a ocorrência de problemas. Algumas empresas alimentares norte-americanas incluem um número de telefone gratuito na rotulagem e todas as reclamações efectuadas são integradas numa base de dados, que discrimina o tipo de reclamação, a localização do consumidor, etc. A partir destes dados, os responsáveis pelo desenvolvimento do alimento ficam com uma noção da não conformidade ocorrida e do tipo de deterioração. É comumente aceite que por cada consumidor que telefona a reclamar, existem cerca de 50 a 60 outros que não o fazem. Este método poderá ser utilizado em conjunto com os três anteriores (Labuza, 2000).

e) Modelos predictivos: utilizam equações matemáticas, que integram informação de bases de dados científicos, para prever o crescimento microbiano sob condições definidas. Nestes estudos, é fundamental recolher informação sobre a deterioração das propriedades do produto e da embalagem. Muitos destes modelos predictivos são específicos para um determinado microrganismo. O uso de modelos predictivos na microbiologia alimentar teve início em 1920, com o desenvolvimento de métodos para calcular o tempo de destruição térmica de microrganismos, que revolucionaram a indústria de conservas (Goldblith *et al.*, 1961, citado por Nakashima *et al.*, 2000).

Actualmente, verifica-se um crescente interesse na aplicação da microbiologia preditiva à indústria alimentar (McMeekin *et al.*, 1993). Tal facto pode ser devido à consciencialização, por parte de muitos técnicos alimentares, de que os métodos microbiológicos tradicionais para a determinação da qualidade e segurança dos alimentos são limitados, devido ao tempo necessário para o desenvolvimento do estudo e obtenção dos resultados, o que lhes conferia pouco valor predictivo (McMeekin *et al.*, 1993). Segundo Buchanan (1993^a), o crescente interesse na aplicação da microbiologia preditiva pode também estar relacionada com o aumento da facilidade de acesso aos computadores, o que permite solucionar de modo rápido equações matemáticas mais ou menos complexas e aplicar ferramentas estatísticas de modo expedito (Buchanan, 1993^b).

Os benefícios consequentes da aplicação da microbiologia preditiva são muitos, mas dependem de uma melhor compreensão e controlo da ecologia microbiana dos alimentos (Nakashima *et al.*, 2000, Dens, 2001). Apesar de já estarem disponíveis comercialmente alguns sistemas informáticos de modelos predictivos, os benefícios decorrentes da sua aplicação dependem da obtenção rigorosa e consciente dos dados (McMeekin *et al.*, 1993). Contudo, e apesar da informação recolhida ser muito útil, estes estudos devem ser verificados com um estudo acelerado de vida útil ou com o método directo de verificação da vida útil (Labuza, 2000).

f) Teste de aceleração da vida útil: é um dos métodos mais utilizados, embora o desenho experimental e/ou os resultados obtidos possam ser incorrectamente interpretados. O objectivo do método é estimar a vida útil de um determinado alimento (considerando diferentes condições de armazenamento, normalmente impróprias) submetendo-o a análises periódicas até que atinja o final da sua vida útil, utilizando estes dados para estabelecer a vida útil em condições normais de armazenamento (Labuza, 2000).

Os métodos de aceleração da vida útil são usados não só em alimentos, mas também em produtos farmacêuticos, cosméticos e noutros produtos industriais cuja vida útil é limitada (Corradini & Peleg, 2007). O delineamento experimental deste tipo de estudos visa acelerar a alteração físico-química do alimento em causa, em condições controladas. Os dados obtidos são depois comparados com aqueles resultantes de condições normais de armazenamento, sendo posteriormente possível utilizar um modelo para efectuar uma previsão das alterações expectáveis em condições normais de armazenamento (Hough, 2006). Usualmente, a deterioração

acelerada é assegurada pela exposição a temperaturas elevadas, mas podem ser usadas outras condições, como se pode observar na Tabela 11.

Tabela 11 – Condições comumente utilizadas nos estudos acelerados de vida útil e seus efeitos nos alimentos (Hough, 2006)

Condição	Efeito
Temperatura elevada	Rancificação
Baixas temperaturas	“Envelhecimento” do pão
Ciclos de temperatura	Formação de cristais de gelo em congelados
Aumento da humidade relativa	Amolecimento de alimentos estaladiços
Exposição a grande intensidade luminosa	Perda de cor
Agitação mecânica	Desestabilização de emulsões

Interessa ainda referir que uma vantagem dos estudos de aceleração da vida útil é a possibilidade de avaliar o impacto de curtas exposições a condições anormais de armazenamento (e, portanto, diferentes das indicadas na rotulagem do alimento) e que podem ocorrer, por exemplo, durante o transporte (NF V 01-003, 2004; Hough, 2006).

Contudo, as limitações dos estudos de aceleração da vida útil são ainda consideráveis, nomeadamente:

- Só são válidos se o mecanismo limitante da vida útil não sofrer alteração;
- A altas temperaturas ocorrem determinados processos que podem modificar o processo deteriorativo, como por exemplo: alterações de fase devido à dissolução da gordura, dissolução de materiais solúveis, desnaturação proteica ou alterações da solubidade do oxigénio;
- As previsões são apenas seguras em alimentos simples;
- Podem surgir questões ligadas à segurança do alimento se houver alteração da ecologia microbiana;
- Necessidade de executar um teste de vida útil em condições normais de armazenamento paralelamente para ser possível a aplicação do modelo (Hough, 2006);
-
-

- A solubilidade gasosa, sobretudo a do oxigénio, diminui cerca de 25% por cada subida de 10°C na temperatura, o que poderá condicionar um aumento das reacções oxidativas;
- Durante a congelação, pode ocorrer concentração dos reagentes no líquido de escorrência, o que pode acelerar a perda de qualidade do produto (Fu & Labuza, 2000).

g) Testes de desafio: este tipo de teste estabelece e valida a segurança dos alimentos, considerando determinada vida útil (New Zeland Food Safety Authority, 2005).

Este tipo de estudo é utilizado para determinar se a especificação do produto ou as condições de armazenamento do alimento conseguem controlar o eventual crescimento microbiano, durante a vida útil desejada para o produto.

Num teste de desafio, o alimento é inoculado com um microrganismo patogénico conhecido ou com um microrganismo não-patogénico com características similares às do patogénico (Malakar *et al.*, 1999). A escolha do microrganismo a inocular depende da existência de dados epidemiológicos e/ ou comerciais que indiquem que o alimento em questão poderá ser perigoso para o consumidor devido ao crescimento desse patogénico (Vestergaard, 2001). A Tabela 12 apresenta alguns microrganismos cuja utilização é recomendada em determinados alimentos submetidos a testes de desafio. Após a inoculação, o alimento é mantido em condições de armazenamento semelhantes à realidade e é medido o crescimento dos microrganismos inoculados (FSAI), de modo a determinar a vida útil do produto (New Zeland Food Safety Authority, 2005).

Em muitos alimentos, o efeito de conservação resulta de uma combinação de factores intrínsecos, como o pH e a a_w , e extrínsecos, como a temperatura, e que individualmente não seriam suficientes para controlar a segurança do produto. Sempre que o efeito de conservação não é previsível para um determinado microrganismo ou na inexistência de bibliografia sobre o comportamento de um determinado alimento, dever-se-á utilizar um teste de desafio para avaliar a segurança do produto (Vestergaard, 2001).

Tabela 12 – Microrganismos patogénicos indicados para estudos de desafio em diferentes alimentos (Vestergaard, 2001)

Alimento	Microrganismo
Molhos para saladas	<i>Salmonellae, Staphylococcus aureus</i>
Produtos embalados em atmosfera modificada (vegetais, carne, aves, pescado)	<i>Clostridium botulinum</i> (proteolítico e não – proteolítico) e outros patogénicos (como <i>Salmonellae, Listeria monocytogenes</i> e <i>E. coli</i> entero-hemorrágica)
Produtos de pastelaria (cremes e pastas)	<i>Salmonellae, S. aureus</i>
Molhos e recheios conservados à temperatura ambiente	<i>Salmonellae, S. aureus</i>
Lacticínios	<i>Salmonellae, S. aureus, C. botulinum, E. coli</i> entero-hemorrágica, <i>L. monocytogenes</i>
Produtos de confeitaria	<i>Salmonellae</i>
Alimentos formulados com novos conservantes	<i>Salmonellae, S. aureus, C. botulinum, E. coli</i> entero-hemorrágica, <i>L. monocytogenes</i>

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PROCESSO DE FABRICO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de bacalhau com natas em estudo foram elaboradas em três dias distintos, numa cozinha industrial, tendo sido extraídas de lotes produzidos em condições normais de processamento. Os referidos lotes foram efectuados de acordo com a Especificação Técnica de Produto que figura no Anexo I.

Após a mistura final e confecção a 75°C durante 5 minutos (Figura 3) numa frigideira industrial basculante, o produto foi colocado em tabuleiros de tereftalato de polietileno cristalizado (CPET, Eloimagem, Portugal) de 40 x 30 cm. O CPET foi desenvolvido no início da década de 1980, a partir do tereftalato de polietileno (PET) e possui alta estabilidade térmica (-40º a +200ºC), o que permite a sua utilização tanto em forno microondas como em forno tradicional, bem como a baixas temperaturas (refrigeração e congelação).



Figura 3 – Mistura final e cozedura do bacalhau com natas.

Posteriormente, o produto foi dividido em dois lotes distintos, sendo um submetido ao método “cook-chill” e o outro ao método “cook-freeze”, conforme descrição efectuada em 3.2.3.1 e 3.2.3.2, respectivamente.



A



B

Figura 4 – Lote “cook-chill” (A) na célula de arrefecimento rápido e lote “cook-freeze” (B) à entrada do túnel de congelação.

De modo a que fosse possível a monitorização da temperatura durante o arrefecimento rápido e a ultracongelação, foram introduzidas sondas “data-loggers” (HT120, Dickson, Estados Unidos da América) nos tabuleiros de bacalhau com natas destinados ao presente estudo.

As sondas “data-loggers” foram higienizadas com solução detergente e desinfetante e devidamente secos com gaze esterilizada antes de entrarem em contacto com o alimento. As sondas “data-loggers” foram introduzidas no centro geométrico do tabuleiro, conforme Figura 5.



Figura 5 – Introdução das sondas “data-loggers” nos tabuleiros.

Após o arrefecimento rápido e a ultracongelação, as embalagens foram termo-seladas com filme-manga PA/ PE (20% Poliamida e 75% Polietileno, Novum, Portugal) coextrudido de 80 microns numa termo-seladora (Reetray 25 FS, Reepack, Itália) e rotuladas (Figura 6).



Figura 6 – Acabamento da embalagem.

As amostras foram transportadas até ao laboratório, em caixa isotérmica (45 minutos), tendo sido armazenadas a cerca de 4°C e a cerca de -20°C respectivamente (Figura 7).



Figura 7– Caixa isotérmica de transporte de refeições refrigeradas e congeladas.

No caso das amostras congeladas, procedeu-se à descongelação das mesmas em refrigeração (7°C, durante 24 horas), para a realização das análises.

Também a temperatura ambiente da câmara de refrigeração e da câmara de conservação de congelados do laboratório onde se realizou o estudo foi monitorizada com recurso a “data-loggers” (TinyTag Ultra, Gemini Data Loggers Ltd., Reino Unido).

4.2. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS DAS AMOSTRAS

A avaliação das características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais das amostras “cook-chill” foi realizada durante 8 dias, incluindo o dia da produção, enquanto para as amostras “cook-freeze” essa avaliação decorreu durante 6 meses após a produção. Foram avaliados três lotes produzidos em dias diferentes, conforme é possível verificar na Tabela 13.

Os momentos de análise também se encontram sumariados na Tabela 13, na qual é atribuído um código a cada amostra, uma vez que a unidade temporal é diferente para os dois tipos de amostras (“cook-chill” e “cook-freeze”) em estudo.

Tabela 13 – Delineamento experimental

Amostra	Data de produção do lote	Momento de análise (tempo após a produção dos lotes)	Código da amostra
“cook-chill”	17/01/2006	1 dia	C1₁
		3 dias	C1₂
		6 dias	C1₃
		8 dias	C1₄
	24/01/2006	1 dia	C2₁
		3 dias	C2₂
		6 dias	C2₃
		8 dias	C2₄
	31/01/2006	1 dia	C3₁
		3 dias	C3₂
		6 dias	C3₃
		8 dias	C3₄
“cook-freeze”	17/01/2006	0 meses	F1₁
		2 meses	F1₂
		4 meses	F1₃
		6 meses	F1₄
	24/01/2006	0 meses	F2₁
		2 meses	F2₂
		4 meses	F2₃
		6 meses	F2₄
	31/01/2006	0 meses	F3₁
		2 meses	F3₂
		4 meses	F3₃
		6 meses	F3₄

4.2.1 Análises microbiológicas

A análise microbiológica de alimentos é um meio expedito e objectivo de verificação da salubridade dos alimentos, sendo também utilizada para garantir a sua qualidade comercial. Nem sempre a presença de microrganismos nos alimentos significa um perigo para a saúde do consumidor, pelo que é de suma importância determinar que microrganismos estão presentes e em que quantidade.

A evolução da flora microbiana é um dos aspectos mais importantes para a determinação do prazo de validade.

Para efeitos do presente estudo foram utilizados os métodos clássicos da microbiologia, como a seguir se descreve.

4.2.1.1 Preparação da amostra

A preparação da amostra para análise microbiológica constitui o processo pelo qual a amostra é tornada apta para quantificação dos microrganismos nela existentes (por unidade de volume ou de massa), bem como a sua identificação e para efeitos do presente estudo foi efectuada segundo a NP 2079/1989.

No caso da amostra congelada, procedeu-se à descongelação da amostra em refrigeração (0°C, durante 24 horas), utilizando em seguida a mesma metodologia.

A amostra para análise obteve-se pela recolha, com os devidos cuidados de assepsia, de pequenas porções de diferentes zonas do tabuleiro (Figura 8), que se pesaram em recipiente adequado e esterilizado. Adicionou-se o volume requerido de solução salina de APT (Água Peptonada Tamponada, Difco Laboratories, Reino Unido) e procedeu-se à homogeneização durante 1 minuto num homogeneizador Stomacher Lab-Blender 400.



Figura 8 – Amostra antes da pesagem.

4.2.1.2 Preparação das diluições

Diluição é o processo de redução do número de microrganismos por unidade de volume, a partir do produto alimentar, de modo a tornar possível a contagem dos microrganismos existentes numa quantidade conhecida do produto. A primeira diluição (suspensão - inicial) é a suspensão obtida de uma porção, pesada, do produto a analisar, numa quantidade de diluente - Triptona sal esterilizada, nove vezes a do produto. As diluições decimais obtêm-se por mistura de um determinado volume da suspensão-inicial e das diluições subsequentes em nove vezes o seu volume em diluente, repetindo esta operação para cada diluição até se conseguir a diluição decimal desejada.

No primeiro ensaio realizado para a contagem de microrganismos, considerou-se apropriado realizar diluições decimais até 10^{-4} , uma vez que não se esperava encontrar microrganismos para além desta diluição. Nos restantes tempos de análise, utilizaram-se apenas diluições decimais até 10^{-3} .

A preparação das diluições para o presente estudo foi efectuada de acordo com a NP 3005/1985.

4.2.1.3 Contagem de microrganismos a 30°C

Das diferentes diluições decimais, retirou-se 1 ml de inóculo que se semeou, por incorporação, em meio de cultura TGA (Triptose Glucose Extract Agar, Scharlau Chemie, Espanha), tendo-se efectuado a contagem de colónias após incubação a 30°C, durante 48 horas, em aerobiose, tal como é preconizado na NP 1995/1982.

Os resultados foram expressos em log do número de unidades formadoras de colónias por grama (log UFC/g).

4.2.1.4 Contagem de *Enterobacteriaceae*

Realizou-se uma sementeira por incorporação de 1 ml das diluições decimais escolhidas, em meio de cultura VRBD (Violet Red Bile Dextrose Agar, Scharlau Chemie, Espanha), tendo-se efectuado a contagem de colónias após a incubação a 37°C, durante 48 horas, em aerobiose, conforme a NP 4137/1991.

Os resultados foram expressos em log do número de unidades formadoras de colónias por grama (log UFC/g).

4.2.1.5 Contagem de *Escherichia coli*

Realizou-se uma sementeira por incorporação de 1 ml de cada diluição, em meio de cultura Gelose Tergitol BCIG (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucorónico; Biokar Diagnostics, Espanha), ao que se seguiu a incubação, durante 24 horas, a 44,5°C, de acordo com a NP 4396/2002.

Os resultados foram expressos em log do número de unidades formadoras de colónias por grama (log UFC/g).

4.2.1.6 Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada de acordo com a Norma ISO/DIS 6579/2002. Assim, a partir de 25 g de amostra, efectuou-se um pré-enriquecimento com APT (Buffer Peptone Water, Difco Laboratoires, Reino Unido), que incubou durante 16 horas a 37°C. Procedeu-se, de seguida, a um enriquecimento, inoculando 1 ml do pré-enriquecimento em meios RVS (Rappaport Vassiliadis Broth, Scharlau Chemie, Espanha) e MKTT (Muller-Kauffmann Medium Base, Scharlau Chemie, Espanha), os quais foram incubados durante 24 h, a 42°C e 37°C, respectivamente.

A partir dos meios de enriquecimento, realizou-se a sementeira por espalhamento à superfície dos meios de cultura selectivos, XLD (Xylose Lysine Deoxycholate, Scharlau Chemie, Espanha) e Hektoen (Hektoen Enteric Agar, Scharlau Chemie, Espanha), que se incubaram a 37°C durante 24 horas. De seguida, as colónias suspeitas de *Salmonella* spp. foram repicadas para o meio de TSI (Triple Sugar Iron Agar; Oxoid, Inglaterra) em tubo. Incubou-se a 37 \pm 1°C, durante 24 \pm 3 horas. Findo o período de incubação, os tubos cujo resultado foi suspeito ou positivo para a presença de *Salmonella* spp., foram então isoladas em TSA (Tryptic Soy Agar, Scharlau Chemie, Espanha) e voltou-se a incubar novamente a 37 \pm 1°C, durante 24 \pm 3 horas, sendo depois classificadas de acordo com os resultados das reacções bioquímicas dos testes miniaturizados API20E (BioMerieux, França).

4.2.1.7 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Para a pesquisa de *L. monocytogenes*, utilizou-se como referência a Norma ISO/DIS 11290-1 (1996), e utilizou-se 25 gramas de amostra pesada assepticamente. Primeiramente, foi efectuado um enriquecimento no meio Fraser I (Merck, Alemanha)

incubado a 30°C durante 24 horas, com posterior repicagem para Fraser II (Merck, Alemanha), incubado a 37°C durante 24 horas. O isolamento foi efectuado a partir dos meios de enriquecimento mediante sementeira por estria à superfície do meio de cultura Modified Oxford Medium (Difco, Inglaterra), seguido de incubação a 37°C durante 24 horas.

Para confirmação das colónias suspeitas realizou-se a repicagem para meio TSA (Tryptic Soy Agar, Scharlau Chemie, Espanha) seguida de incubação a 37°C durante 24 horas. Observou-se ao microscópio por transiluminação de Henry as colónias que cresceram em TSA, tendo-se efectuado os testes da catalase e da oxidase às colónias que apresentaram luminescência azul. Para identificação e confirmação das colónias suspeitas utilizaram-se os testes bioquímicos miniaturizados APIListeria (BioMerieux, França).

4.2.1.8 Pesquisa de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo

Para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* foram efectuadas sementeiras de 1g, 0,1g e 0,01g de amostra em tubo com meio de cultura Chapman (5 gramas de peptona, 5 gramas de triptona, 3 gramas de extracto de carne, 75 gramas de NaCl, 7,5 gramas de lactose, 0,5 gramas de agar, 1 litro de água destilada). Este enriquecimento foi efectuado a 37°C durante 48 horas, após as quais se fez um isolamento por repicagem com ansa para placas com meio de cultivo Baird-Parker (Merck, Alemanha) incubando-se a 37°C durante 24 horas. As colónias suspeitas (negras, com halo transparente) foram repicadas para caldo BHI ("Brain Heart Infusion", Scharlau, Espanha) incubando-se novamente a 37°C durante 24 horas, efectuando-se posteriormente a prova da catalase com plasma de coelho liofilizado (Biomerieux, França), tal como preconizado na NP 4400-2/2002.

4.2.1.9 Contagem de microrganismos psicrotróficos

Das respectivas diluições decimais, retirou-se 1 mililitro de inóculo que se semeou, por incorporação, em meio de cultura TGA (Tryptone Glucose Extract Agar, Scharlau Chemie, Espanha), tendo-se efectuado a contagem de colónias após incubação a 7°C, durante 10 dias, em aerobiose, segundo a NP 2307/1987.

Os resultados foram expressos em log do número de unidades formadoras de colónias por grama (Log UFC/g).

4.2.2 Análises físico-químicas

Foi realizada a determinação do potencial hidrogeniónico (pH) pois é uma determinação que permite uma rápida caracterização do produto; relativamente ao azoto básico volátil total (ABVT), esta determinação permite avaliar a degradação proteica de origem microbiana; e considerando que o bacalhau com natas é um produto rico em gordura (tal como indicado no boletim de análise centesimal que se encontra no Anexo II), foi também efectuada a determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA), que dá indicação da alteração das gorduras.

4.2.2.1 Determinação do potencial hidrogeniónico

Entende-se por potencial hidrogeniónico (pH), o logaritmo do inverso da concentração hidrogeniónica, expressa em hidrogeniões grama por litro.

Utilizando a NP 3441/1990 como referência, após a homogeneização da amostra, introduziu-se a mesma num copo plástico de forma a possibilitar a imersão do eléctrodo do potenciómetro (HI 9025, Hanna Instruments, Estados Unidos da América).

Foram efectuadas três medições por amostra. Em cada medição aguardou-se até à obtenção de um valor constante.

4.2.2.2 Determinação do azoto básico volátil total (ABVT)

A determinação do ABVT visa a quantificação do conjunto do amoníaco e das aminas voláteis. O ABVT é utilizado como indicador do grau de frescura de alimentos.

A determinação do ABVT foi efectuada de acordo com a NP 1848/1987, cujo método tem por base a extracção das bases voláteis pelo ácido tricloroacético. Posteriormente, é utilizado carbonato de potássio, de forma a induzir a libertação das bases voláteis, cuja titulação é depois efectuada com ácido clorídrico, de acordo com o descrito na NP 1848/1987.

4.2.2.3 Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico

Por índice do ácido tiobarbitúrico (TBA) entende-se a quantidade, em miligramas, de aldeído malónico, por cada 1000 gramas de produto. O índice do ácido

tiobarbitúrico é um indicador do grau de oxidação lipídica dos alimentos, que não é inactivado pelo frio.

Uma das principais causas de alteração no sabor de um alimento é a oxidação lipídica, que afecta os ácidos gordos em geral e os ácidos gordos poli-insaturados em particular (Gray, 1978, Fennema, 1993 citados por Li, 1999).

De acordo com a referida Norma, o aldeído malónico é extraído com uma mistura de ácido tricloroacético, galato de propilo e EDTA. A reacção do aldeído malónico com o ácido tiobarbitúrico, origina um complexo corado de vermelho, cuja absorvência é medida em espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Reino Unido) num comprimento de onda de 530 nanómetros, tal como preconizado na NP 3356/1990.

4.2.2.4 Monitorização da temperatura

A monitorização da temperatura interna das amostras, bem como a temperatura ambiente das câmaras frigoríficas e de conservação da congelação do laboratório onde foi efectuado o estudo foram monitorizadas durante todo o estudo através do uso de “data-loggers” calibrados. Para as amostras “cook-chill” e “cook-freeze” foram utilizados equipamentos HT120 (Dickson, Estados Unidos da América), enquanto que para a monitorização da temperatura ambiente das câmaras foram utilizados equipamentos TinyTag Ultra (Gemini Data Loggers Ltd., Reino Unido).

4.2.3 Análise Sensorial

Para muitos alimentos, o final da vida útil é determinado por alterações de ordem química e/ou física, que condicionam alterações sensoriais. Muitas vezes os alimentos não se deterioram em função do crescimento microbiano (considerando um correcto armazenamento) e assim, o prazo de validade é determinado por alterações sensoriais. Portanto, na determinação da vida útil de alimentos tem especial importância a avaliação sensorial dos produtos. (Fu *et al.*, 2000, Brown, 2006).

Os métodos sensoriais permitem avaliar o aspecto, a textura, o cheiro e o sabor de amostras de alimentos através da percepção dos sentidos humanos, como o olfacto, a visão e o paladar.

4.2.3.1 Constituição do painel de análise sensorial

A análise sensorial das amostras “cook-chill” e “cook-freeze”, processadas de acordo com o descrito em 1. *Processo de fabrico e obtenção da amostra*, foi efectuada por um painel constituído, no mínimo, por nove elementos não treinados, recrutados dentre os colaboradores da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. Todos os elementos do painel de provadores conheciam, enquanto consumidores, o produto em prova, mas não lhes foi transmitida qualquer informação sobre o método tecnológico a que haviam sido sujeitas as amostras em prova.

Na análise hedónica, de modo a que os resultados obtidos sejam válidos é necessário o cumprimento estrito de requisitos relacionados com o painel (tais como o número de elementos, experiência e uniformidade) e também relacionados com o produto (escala de classificação adaptada ao alimento em questão) (Labuza, 2000).

4.2.3.2 Preparação e apresentação das amostras

As amostras de bacalhau com natas “cook-chill” e “cook-freeze” embaladas em embalagem CPET e armazenadas a 4°C e -20°C, respectivamente, foram regeneradas em forno eléctrico a 180°C durante 40 minutos e apresentadas de seguida ao painel de provadores, nos tempos descritos na Tabela 13, relativa ao delineamento experimental.

Cada amostra para análise sensorial foi servida no momento da prova e entregue aos elementos do painel, que tinham de preencher individualmente e em silêncio uma ficha de análise (Anexo III).

Apenas as amostras C1₁ e F1₁ foram provadas simultaneamente.

4.2.3.3 Ficha de análise

A ficha de análise para prova sensorial considerava os seguintes atributos: aspecto, cor, cheiro, sabor, textura e cremosidade.

Estes atributos foram seleccionados com base noutras fichas de análise organoléptica existentes no laboratório de Tecnologia Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa e também com base num estudo sobre análise sensorial de bacalhau descongelado (Boknaes *et al.*, 2002). O atributo cremosidade surge na ficha por mero interesse comercial, isto é, visa confirmar se o tempo de regeneração é o correcto, para efeitos de rotulagem.

5. ANÁLISE DOS DADOS

Todos os dados da avaliação das características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais foram tratados informaticamente numa base de dados criada no programa Microsoft Office Excel para Windows, efectuando-se uma análise descritiva com cálculos das médias dos três ensaios efectuados, correspondentes a três lotes de fabrico.

Considerando os resultados obtidos e o processamento tecnológico de conservação aplicado, efectuaram-se “t-test” para amostras emparelhadas.

Os dados da monitorização das temperaturas das amostras de alimento e das câmaras frigoríficas e de conservação da congelação, foram obtidos com recurso aos programas DicksonWare99 (Dickson, Estados Unidos da América) e Gemini Logger Manager version 2.3. (Gemini Data Loggers, Reino Unido).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados são médias das três repetições efectuadas correspondentes aos três lotes de fabrico da refeição de bacalhau com natas.

6.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

6.1.1 Contagem de microrganismos a 30°C

A evolução das médias das três repetições de contagens de microrganismos a 30°C nas amostras “cook-chill” de bacalhau com natas, não apresenta diferenças significativas ($p>0,05$) entre o dia 1 e o dia 8 dos ensaios, como é possível ver na Figura 9.

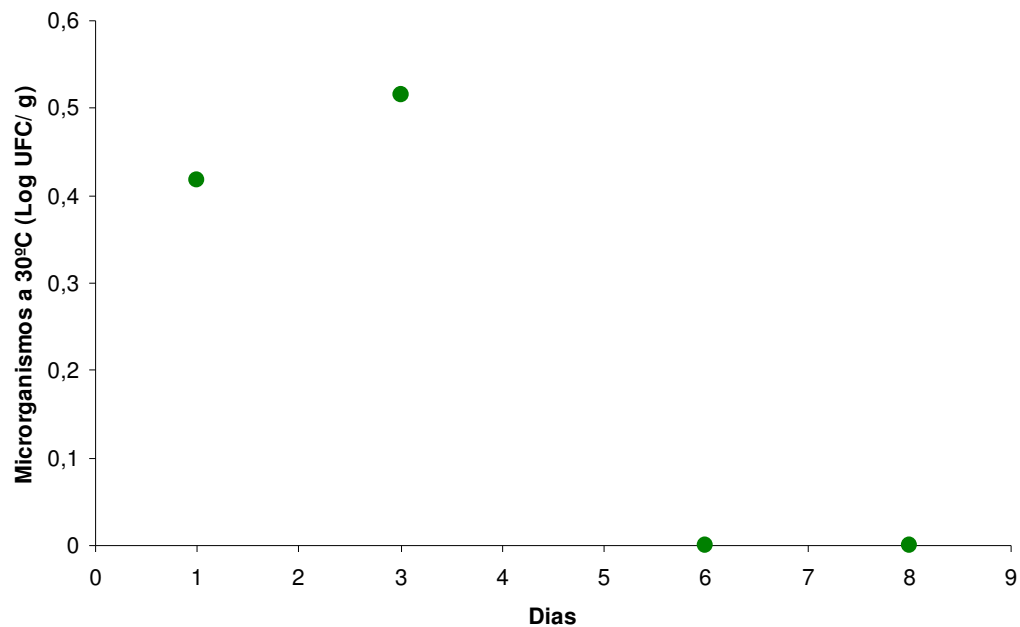


Figura 9 – Evolução das contagens de microrganismos a 30°C nas amostras “cook-chill”, ao longo do tempo de estudo.

Relativamente à evolução das médias das três repetições das contagens de microrganismos a 30°C nas amostras “cook-freeze”, existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os 0 e os 4 meses e entre os 0 e os 6 meses, conforme é possível constatar na Figura 10.

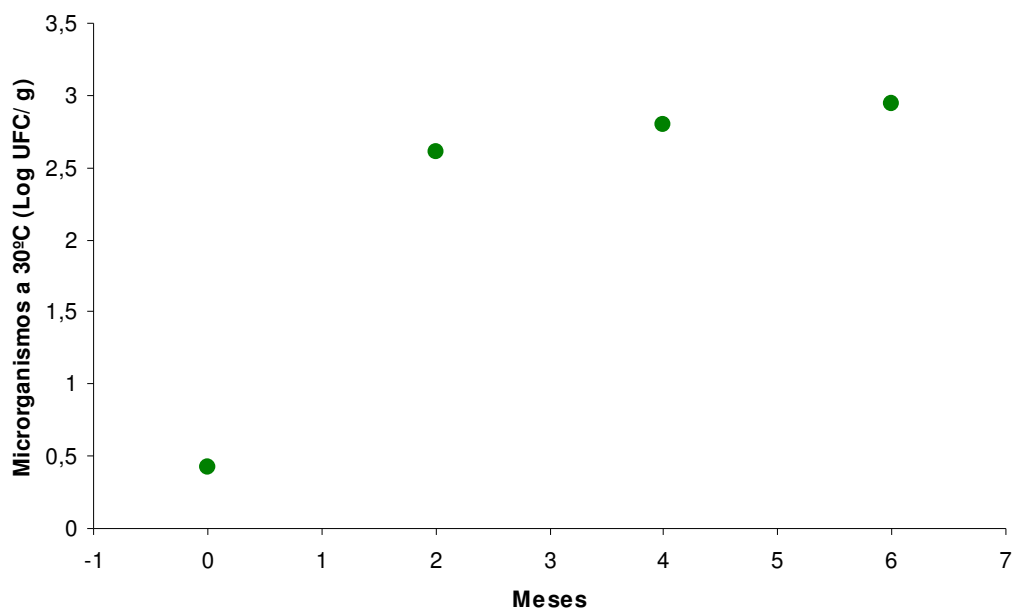


Figura 10 – Evolução das contagens de microrganismos a 30°C nas amostras “cook-freeze”, ao longo do tempo de estudo.

Estes resultados podem ser devidos ao facto de ter ocorrido uma avaria na câmara de conservação de congelados, tendo havido descongelação, devido a uma falha de corrente no início do terceiro mês do estudo, o que possibilitou o desenvolvimento de microrganismos presentes nas amostras. É importante referir que as amostras “cook-freeze” foram analisadas 24 horas depois de se ter iniciado o processo de descongelação à temperatura de 7°C, segundo Geiges (1996), os microrganismos presentes num alimento congelado iniciam a sua multiplicação assim que se inicia a descongelação do produto.

6.1.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*

Não se verificou qualquer desenvolvimento de Enterobactérias, quer nas amostras “cook-chill”, quer nas amostras “cook-freeze”. Tal facto deve-se, provavelmente, à sua inexistência nos lotes originais de bacalhau com natas. Para além disso, de acordo com Geiges (1996) as *Enterobacteriaceae* não são capazes de se desenvolver abaixo do ponto de congelação.

6.1.3 Contagem *Escherichia coli*

Não se verificou desenvolvimento de *E. coli*, quer nas amostras “cook-chill”, quer nas amostras “cook-freeze”.

6.1.4 Pesquisa de *Salmonella* spp

Não houve evidências da presença de *Salmonella* spp. em 25 gramas, quer nas amostras “cook-chill”, quer nas amostras “cook-freeze”.

6.1.5 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Não houve evidências da presença de *L. monocytogenes* em 25 gramas, quer nas amostras “cook-chill”, quer nas amostras “cook-freeze”.

6.1.6 Pesquisa de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo

Não houve evidências da presença de *S. aureus* em 1 grama, quer nas amostras “cook-chill”, quer nas amostras “cook-freeze”.

6.1.7 Contagem de microrganismos psicrotróficos

Não se verificou qualquer desenvolvimento de colónias de bactérias psicrotróficas, quer nas amostras “cook-chill”, quer nas amostras “cook-freeze”, durante as 168 horas de incubação das placas. Tal facto poderá dever-se ao curto período de incubação.

6.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

6.2.1 Determinação do pH

Como é possível verificar na Figura 11, a média dos valores de pH nas amostras “cook-chill” variou entre 6.41 e 6.45 durante os oito dias de análise. Já na Figura 12, a média dos valores de pH nas amostras “cook-freeze” variou entre 6.41 e 6.62 para os seis meses de análise.

As alterações verificadas nos valores de pH ao longo do estudo não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$), quer nas amostras “cook-chill”, quer nas amostras “cook-freeze”, não sendo também sugestivas de degradação.

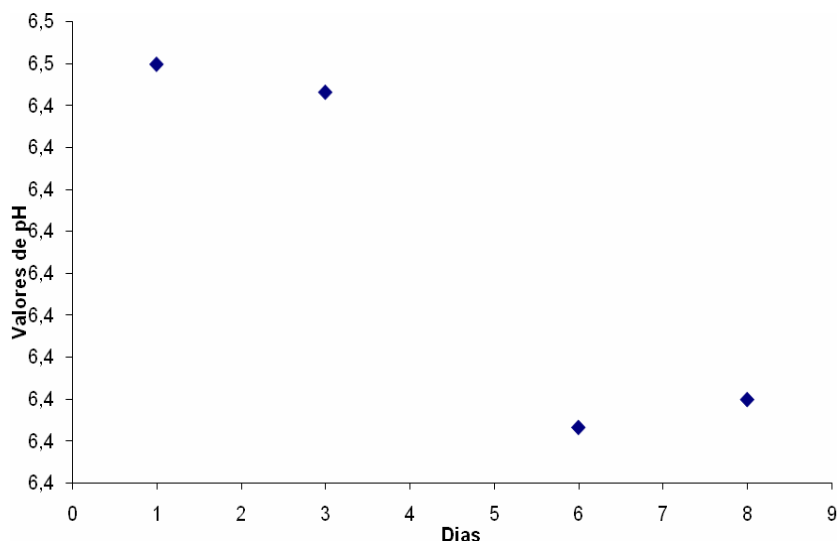


Figura 11 – Valores do pH nas amostras “cook-chill”, ao longo do tempo de estudo.

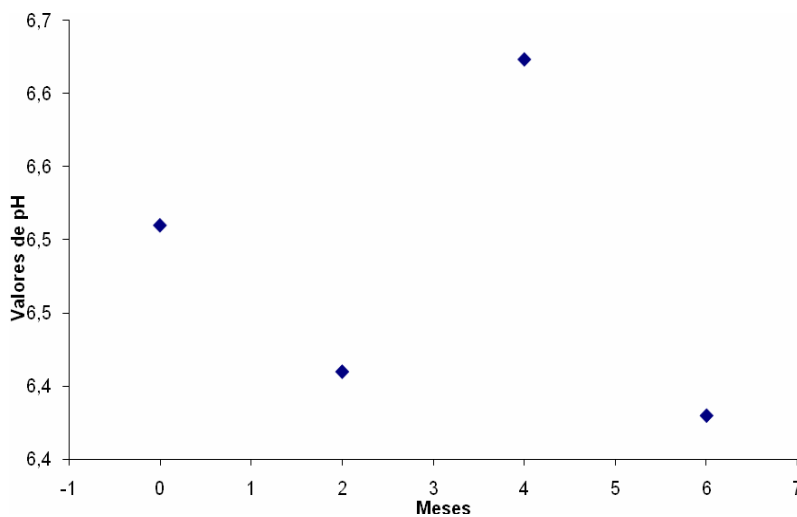


Figura 12 – Valores do pH nas amostras “cook-freeze”, ao longo do tempo de estudo.

6.2.2 Determinação do Azoto Básico Volátil Total (ABVT)

Na Figura 13, é possível verificar que a média do teor de ABVT variou entre 3.0 e 3.7 mg de NH_3 / 100 g de produto nas amostras “cook-chill” nos oito dias de análise. Relativamente às amostras “cook-freeze”, verificou-se que durante os seis meses de estudo, a média do teor de ABVT variou entre 4.1 e 5.8 mg de NH_3 / 100 g de produto.

As alterações verificadas no teor de ABVT ao longo do estudo não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$), quer nas amostras “cook-chill”, quer nas amostras “cook-freeze”, não sendo também sugestivas de degradação.

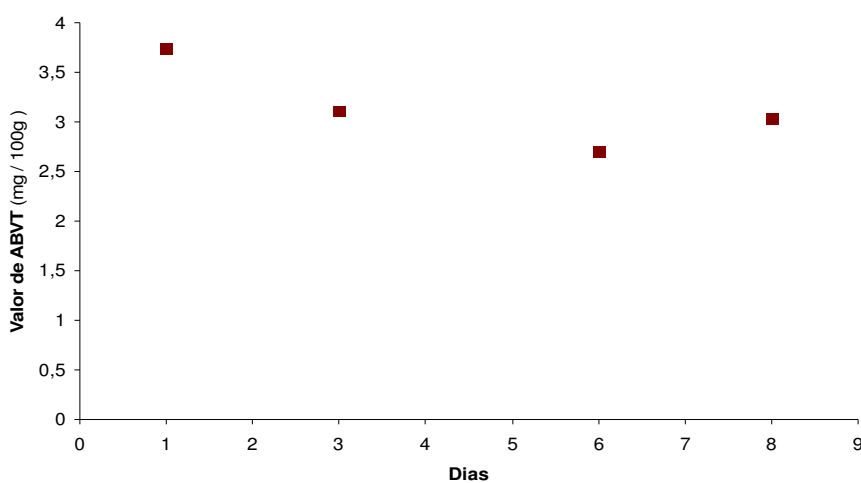


Figura 13 – Valores de Azoto Básico Volátil Total (ABVT), expresso em mg de NH_3 / 100 g de produto, nas amostras “cook-chill”, ao longo do tempo de estudo.

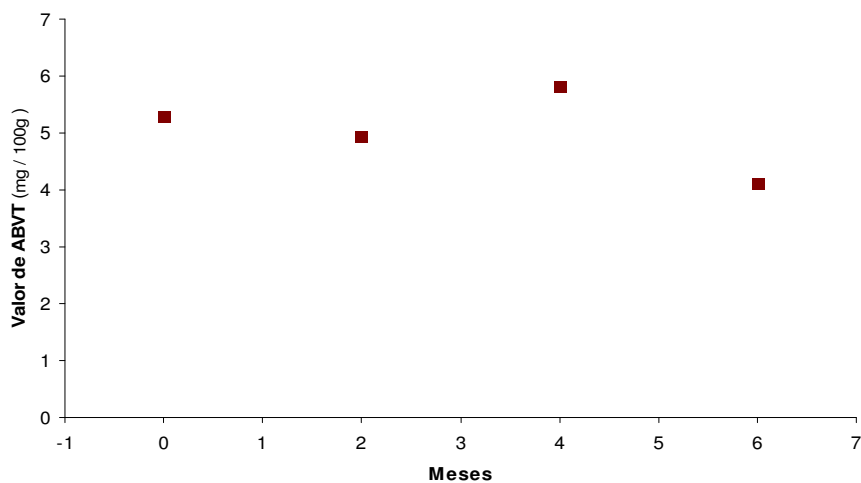


Figura 14 – Valores de Azoto Básico Volátil Total (ABVT), expresso em mg de NH_3 / 100 g de produto, nas amostras “cook-freeze”, ao longo do tempo de estudo.

6.2.3 Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA)

Na Figura 15, é possível verificar que a média do índice de TBA nas amostras “cook-chill” variou entre 0.39 e 0.41 miligramas de aldeído malónico/ 1000 gramas de produto, durante os oito dias do estudo. Relativamente às amostras “cook-freeze”, verificou-se que a média do índice de TBA variou entre 0.36 e 0.44 miligramas de aldeído malónico/ 1000 gramas de produto durante os seis meses do estudo, como é possível ver na Figura 16.

As alterações verificadas nos valores de TBA ao longo do estudo não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$), quer nas amostras “cook-chill”, quer nas amostras “cook-freeze”, não sendo também sugestivas de degradação.

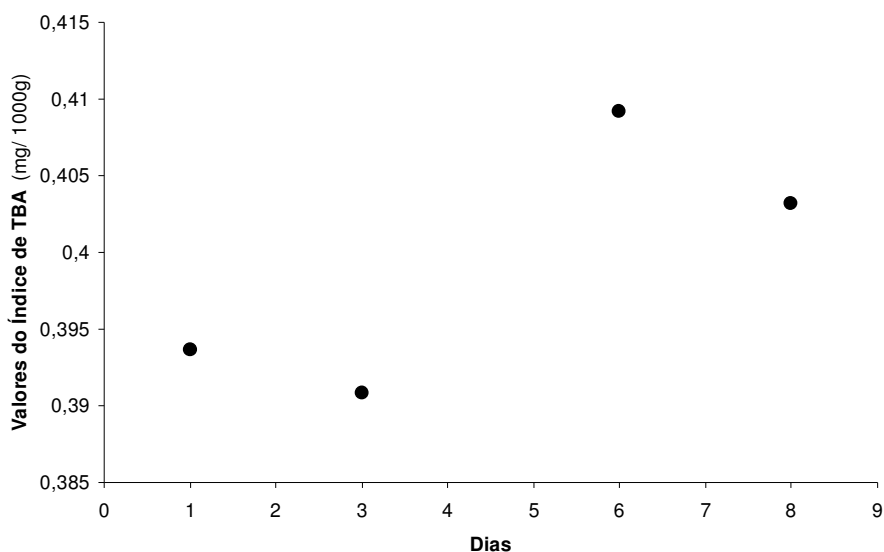


Figura 15 – Valores do Índice de Ácido Tiobarbitúrico (TBA), expresso em mg aldeído malónico/ 1000 g de produto, nas amostras “cook-chill”, ao longo do tempo de estudo

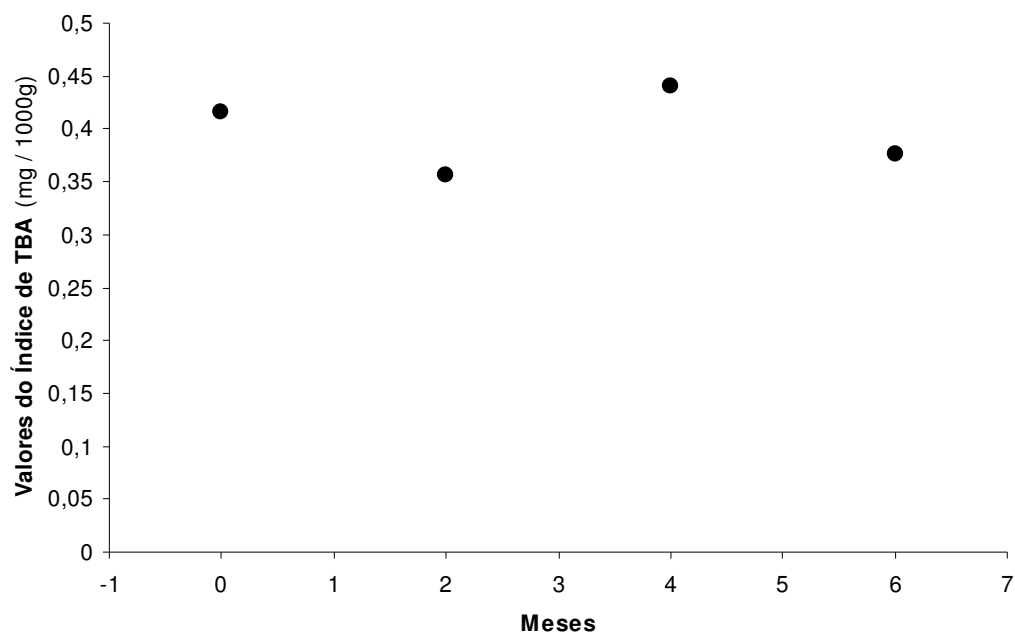


Figura 16 – Valores do Índice de Ácido Tiobarbitúrico (TBA), expresso em mg aldeído malónico/ 1000 g de produto, nas amostras “cook-freeze”, ao longo do tempo de estudo.

3.1 ANÁLISE SENSORIAL

Conforme referido anteriormente as amostras “cook-chill” foram analisadas aos dias 1, 3, 6 e 8 após o fabrico e as amostras “cook-freeze” foram analisadas aos meses 0, 2, 4 e 6 pós-processamento.

Os atributos considerados foram: o aspecto, a cor, o cheiro, o sabor, a textura e a cremosidade.

3.1.1 Atributo aspecto

Ao longo do período em estudo, os provadores classificaram o atributo aspecto das amostras “cook-chill”, predominantemente, como muito agradável e agradável, tendo sido classificado dia 1 como muito agradável por 59% dos provadores e como agradável no dia 8 pela maioria dos provadores (55%), como é possível verificar na Figura 17.

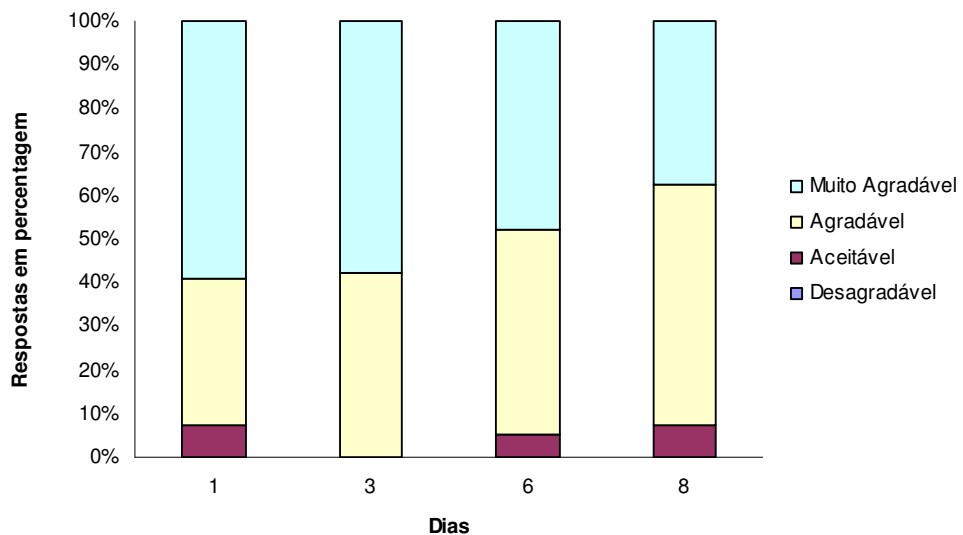


Figura 17 – Classificação do atributo aspecto no bacalhau com natas “cook-chill”, ao longo do estudo.

Já as amostras “cook-freeze”, foram analisadas aos meses 0, 2, 4 e 6 após o fabrico. Verificou-se, para este tipo de processamento, resultados idênticos aos obtidos para as amostras “cook-chill”, isto é, os provadores classificaram o atributo aspecto, predominantemente, como muito agradável e agradável, tendo sido classificado no mês 0, por 58% dos provadores como muito agradável e no mês 6 como agradável por 63% dos provadores, conforme é possível verificar na Figura 18.

Interessa, porém, referir que no mês 0 houve referência ao facto de o atributo aspecto das amostras “cook-freeze” ser desagradável. Poderá ter havido, por alguns provadores, respostas comparativas, o que não constituía um objectivo da análise e que pode ser devido ao facto de a prova sensorial do mês 0 e do dia 1, do primeiro lote, ter decorrido sequencialmente.

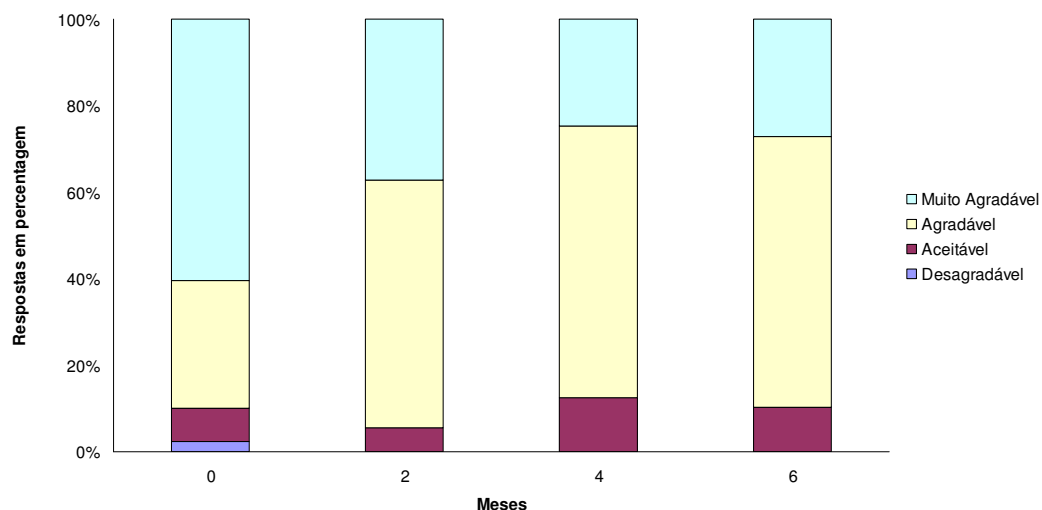


Figura 18 – Classificação do atributo aspecto no bacalhau com natas “cook-freeze”, ao longo do estudo.

3.1.2 Atributo cor

A classificação do atributo cor foi bastante consensual, durante o período em estudo para o processamento “cook-chill”, tendo sido unanimemente classificada como Característica por 95% dos provadores no dia 1 do ensaio e nos restantes dias (3, 6 e 8) foi classificada unanimemente como característica, como é possível ver na Figura 19.

Relativamente às amostras “cook-freeze”, a maioria dos elementos do painel de provadores também considerou a cor da amostra característica em todos os momentos da análise (Figura 20), existindo apenas para o mês 0 após o fabrico referência a cor repulsiva, o que, mais uma vez, poderá estar relacionado com uma eventual comparação entre amostras, por alguns provadores, dado a prova sensorial do mês 0 e do dia 1 pós-processamento, do primeiro lote, ter decorrido sequencialmente.

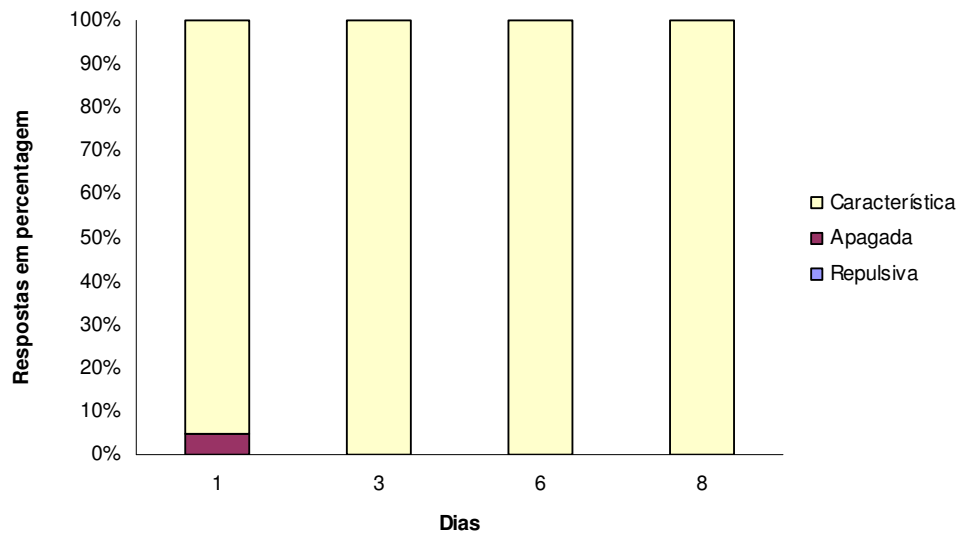


Figura 19 – Classificação do atributo cor nas amostras “cook-chill”, ao longo do estudo.

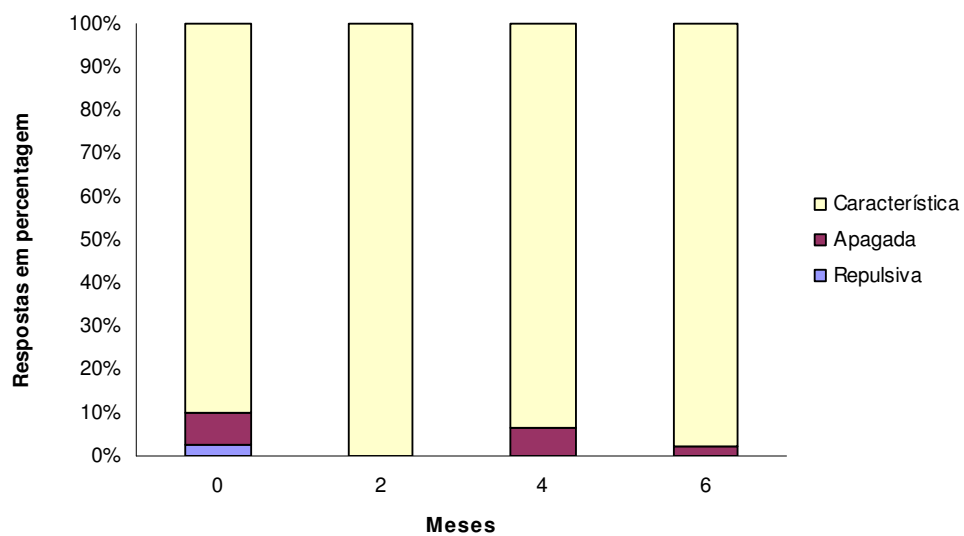


Figura 20 – Classificação do atributo cor nas amostras “cook-freeze”, ao longo do estudo.

3.1.3 Atributo cheiro

Relativamente ao atributo cheiro, este foi classificado com muito agradável e agradável pela maioria dos provadores, quer para as amostras “cook-chill”, quer para as amostras “cook-freeze” ao longo dos tempos de estudo. Interessa ainda referir que tanto no dia 1 após fabrico, como no mês 0 após fabrico, houve 2% de provadores que referiram o cheiro como desagradável, como é possível verificar nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

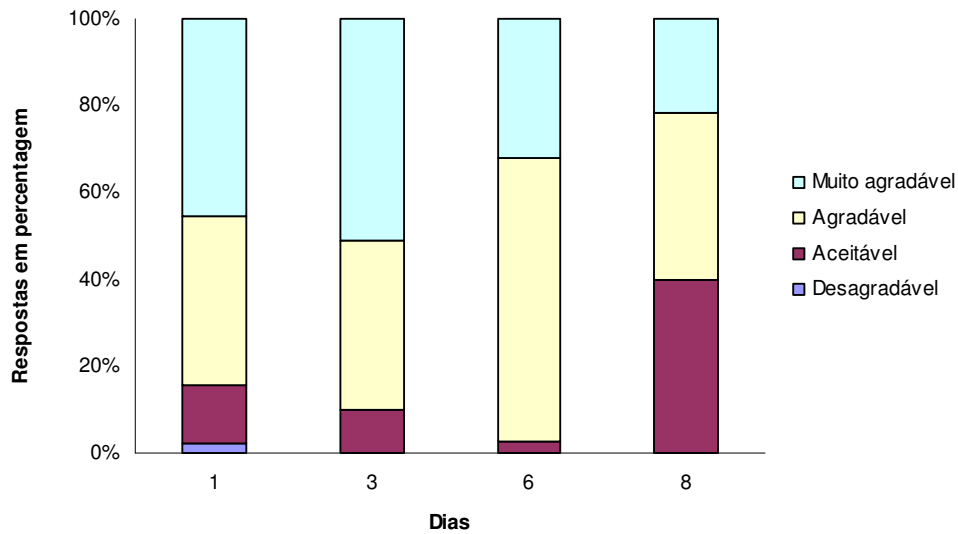


Figura 21 – Classificação do atributo cheiro nas amostras “cook-chill”, ao longo dos oito dias de estudo.

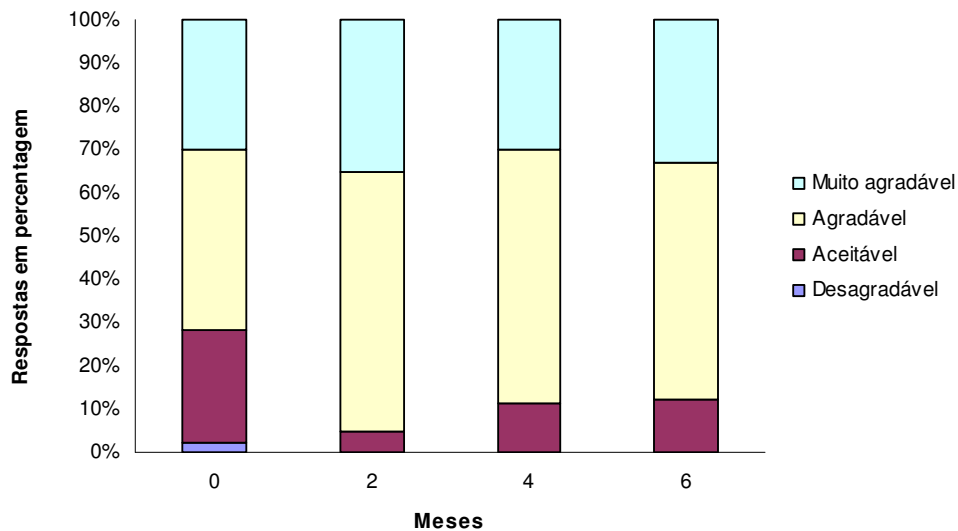


Figura 22 – Classificação do atributo cheiro nas amostras “cook-freeze” durante os seis meses de estudo.

3.1.4 Atributo sabor

Quanto ao atributo sabor, este foi referido como muito agradável e agradável pela maioria dos consumidores, para ambos os tipos de processamento (Figuras 23 e 24). Contudo no dia 8 houve alguns provadores que referiram o sabor como desagradável (8%). Tal facto pode indiciar alteração do produto.

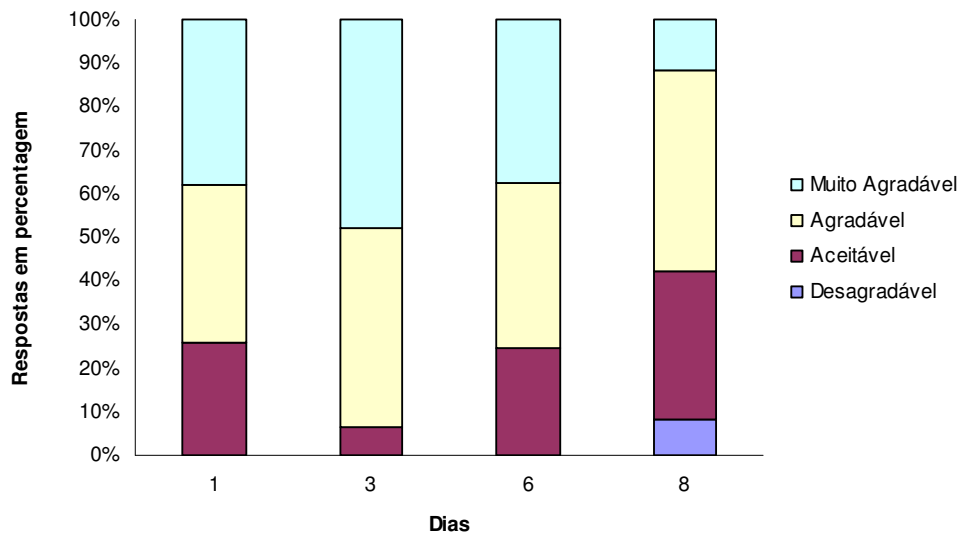


Figura 23 – Classificação do atributo sabor nas amostras “cook-chill”, ao longo do estudo.

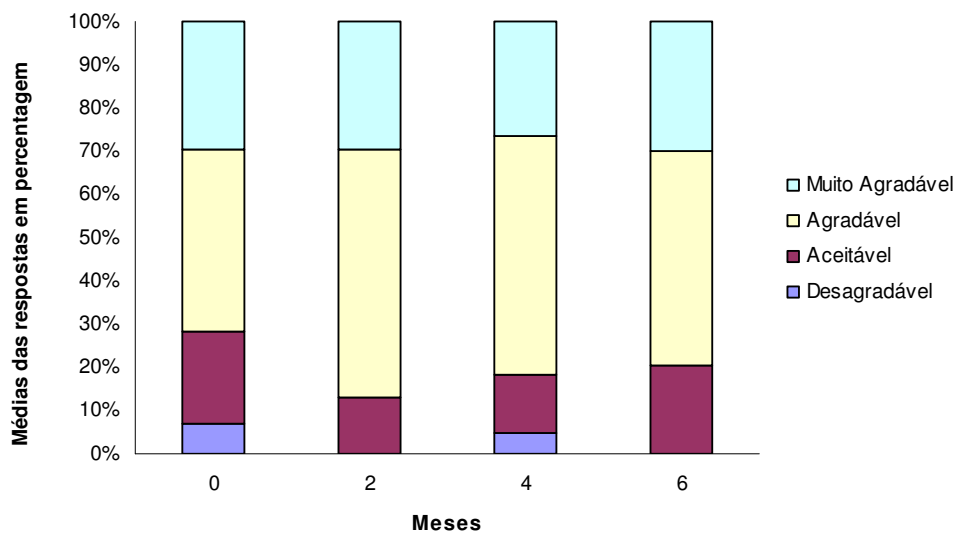


Figura 24 – Classificação do atributo sabor nas amostras “cook-freeze”, ao longo do estudo.

3.1.5 Atributo textura

Relativamente ao atributo textura, a maioria dos provadores considerou-a característica, para ambos os tipos de processamento.

Contudo, no dia 8 houve alguns 20% dos elementos do painel que referiram a textura das amostras “cook-chill” como não característica, como é possível ver na Figura 25. Tal facto pode indiciar alteração do produto.

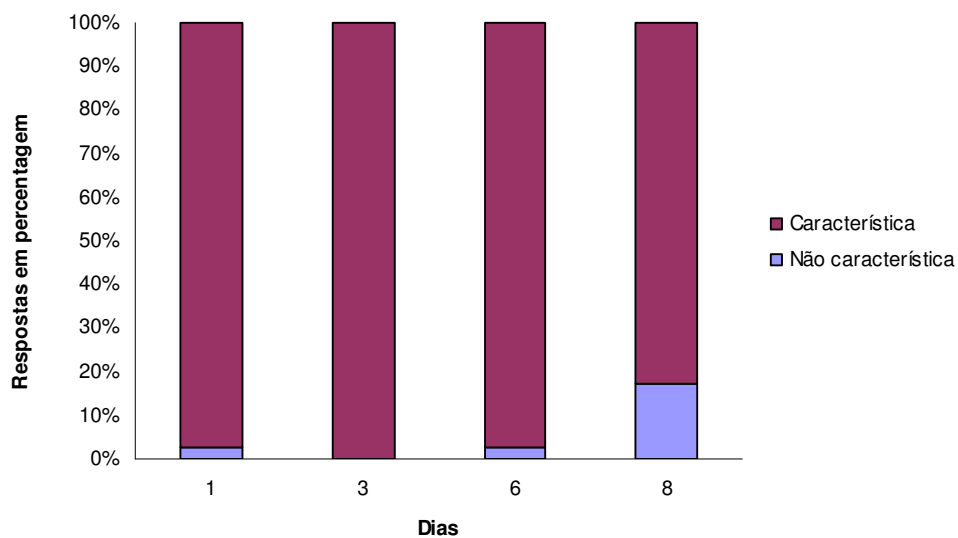


Figura 25 – Classificação do atributo textura nas amostras “cook-chill” ao longo do estudo.

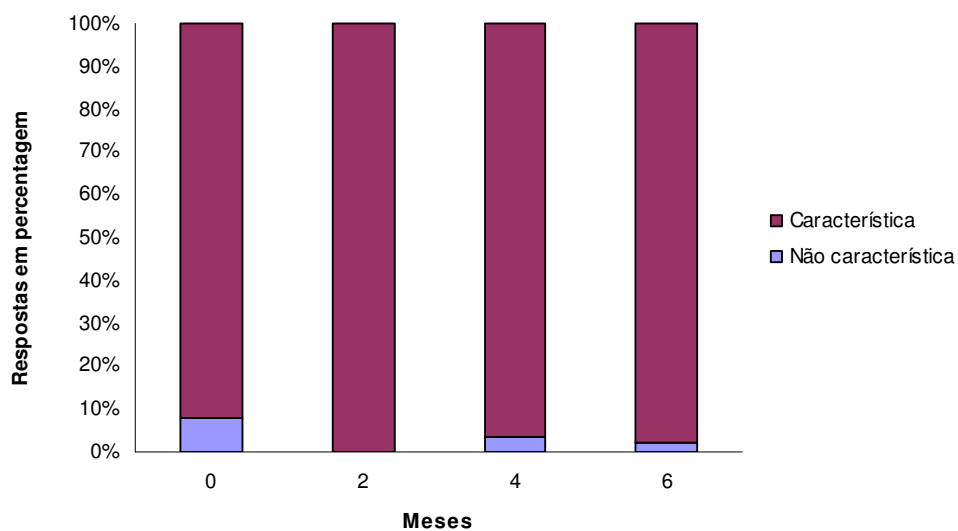


Figura 26 – Classificação do atributo textura nas amostras “cook-freeze” ao longo do estudo.

3.1.6 Atributo cremosidade

O atributo cremosidade foi referido muito cremosos e cremoso pela maioria do provadores, para os dois tipos de amostra em estudo.

Este atributo é largamente influenciado pelo tempo de regeneração, constituindo apenas um controlo para efeitos de qualidade organoléptica do produto final, pois o facto de o bacalhau com natas ser um produto seco não influencia grandemente a sua segurança.

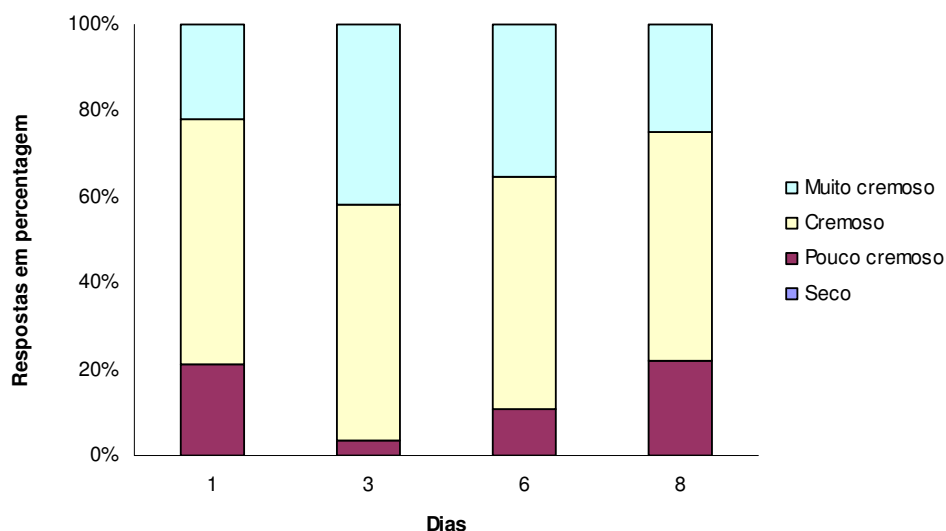


Figura 27 – Classificação do atributo cremosidade nas amostras “cook-chill”, ao longo do estudo.

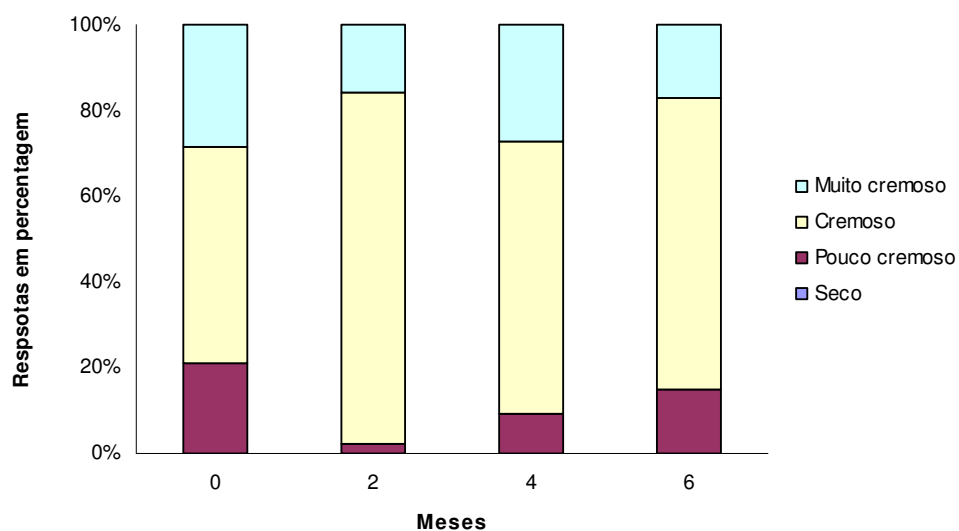


Figura 28 – Classificação do atributo cremosidade nas amostras “cook-freeze”, ao longo do estudo.

6.4 MONITORIZAÇÃO DA TEMPERATURA

Devido a uma falha técnica permanente do software de leitura dos “data-loggers”, só foi possível recuperar a informação de alguns dos dispositivos utilizados. Assim, dos “data-loggers” de monitorização da temperatura das câmaras frigoríficas e de conservação da congelação do laboratório, foi apenas possível recuperar os registos efectuados pelo “data-logger” da câmara de conservação de congelados do laboratório, cujo gráfico se encontra no Anexo IV, e dos “data-loggers” das amostras F2₄ e F3₄ cujos gráficos se encontram no Anexo V.

As temperaturas registadas comprovam a adequação do processamento térmico que as amostras sofreram ao método “cook-freeze”, pois permitem verificar que a etapa da confecção submeteu o alimento a 90°C, apesar das sondas só terem entrado em contacto com o alimento imediatamente após esta etapa. Também é possível verificar que o arrefecimento rápido ocorreu em menos de 90 minutos e foi atingida a temperatura de -22°C. Relativamente ao armazenamento em conservação da congelação, verifica-se que o alimento apresentou sempre temperaturas entre os -23° e os -20°C, estando a câmara, no mesmo período, entre os -25° e os -28°C. É também possível verificar a elevação da temperatura que ocorreu na câmara de conservação de congelados no início do terceiro mês do estudo.

7. VIDA ÚTIL ATRIBUÍDA ÀS AMOSTRAS EM ESTUDO

O bacalhau com natas processado pelo método “cook-chill”, apesar de estável microbiologicamente, denota alguma alteração no Sabor e na Textura ao dia 8 após o fabrico, pelo que a sua vida útil seria estabelecida, preferencialmente, em 6 dias após o fabrico.

Já o bacalhau com natas “cook-freeze”, apesar de apresentar alteração significativa ($p < 0,05$) na contagem de microrganismos a 30°C entre o mês 0 e 4 e o mês 0 e 6, as referidas contagens foram inferiores a 10^2 UFC por grama de alimento, o que permite classificá-lo como alimento de qualidade microbiológica satisfatória, de acordo com os critérios expostos em “Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração” (Santos *et al.*, 2005). Portanto, num estudo futuro, a vida útil deste produto deveria ser analisada durante mais algum tempo, para além dos seis meses já estudados.

8. CONCLUSÃO

Actualmente, a variedade de técnicas já disponíveis e emergentes para conservação e garantia de vida útil alimentar é grande. Relativamente às técnicas emergentes, existem duas questões fundamentais: em primeiro lugar, muitas das novas técnicas são menos agressivas e mais naturais, em resposta às expectativas do consumidor actual; em segundo lugar, e considerando o ponto de vista científico, a eficácia das novas técnicas deve-se ao facto de estas desestabilizarem os diferentes mecanismos homeostáticos que os microrganismos utilizam como forma de combater o stresse ambiental extremo (Gould, 1996). É importante referir que a resposta microbiana a um factor de stresse, pode resultar numa tolerância acrescida a esse e até a outros factores stressantes, e que aparentemente não estão relacionados (Foster & Spector, 1995). E nos microrganismos patogénicos a resposta ao stresse pode incluir um aumento da virulência (Mekalanos, 1992). Portanto, aquando do desenvolvimento de técnicas menos agressivas de conservação alimentar, deverá ter-se em conta que os microrganismos, com maior facilidade, ultrapassarão o stresse imposto (Gould, 1996).

Os potenciais riscos para a segurança alimentar são um factor limitante na aceitação em larga escala da tecnologia “cook-chill”. As falhas na cadeia de frio ocorrem ainda com muita frequência, pelo que a temperatura deverá ser combinada com outras tecnologias, de forma a garantir a segurança do produto final. A escolha do conjunto de tecnologias a aplicar dependerá da informação científica disponível, do efeito global dessas tecnologias sobre a qualidade do alimento em questão, do custo e facilidade de aplicação das tecnologias escolhidas, e de questões legais e comerciais.

A ultracongelação é uma tecnologia excepcional quando se pretende conservar um alimento a longo prazo. Temperaturas de armazenamento superiores a -10°C não deverão ser usadas pois permitem o desenvolvimento de alguns microrganismos tolerantes ao frio, os quais, apesar do crescimento lento, produzem quantidades consideráveis de exoenzimas, especialmente lipases e proteases. As temperaturas de armazenamento inferiores a -18°C , utilizadas comercialmente, previnem com segurança o crescimento microbiano, mas permitem a continuação dos processos enzimáticos (Geiges, 1996).

Dependendo da composição do alimento e do seu estatuto microbiológico antes da congelação, pode considerar-se 3 a 12 meses de vida útil. De um modo

geral, não se utilizam temperaturas inferiores a -18°C , devido ao elevado consumo energético que isso originaria. Na aplicação prática da tecnologia de ultracongelação, os processos microbianos ficam limitados ao efeito das enzimas microbianas. Só se conseguem obter produtos ultracongelados com vidas úteis muito prolongadas se as matérias-primas forem de elevada qualidade e, para isso, os padrões de higiene deverão ser elevados e apenas por breves momentos deverá ocorrer armazenamento a temperaturas superiores a 0°C e os produtos deverão ser congelados tão rápido quanto possível (Sprenger, 2002).

O trabalho desenvolvido nas indústrias alimentares para determinar, testar e ainda para aumentar a vida útil de um alimento, deve ocorrer sob condições apropriadas para garantir que o alimento é estudado de forma correcta. Contudo, a abordagem, o método e as tecnologias usadas para determinar a vida útil de um alimento, são tão variadas como os alimentos e bebidas testados (Labuza, 2000).

Relativamente ao trabalho prático desenvolvido, as amostras “cook-chill” revelaram valores satisfatórios de qualidade microbiológica nas contagens de microrganismos a 30°C (contagens inferiores a 10^2 UFC por grama de alimento) considerando o estudo compilado nos “Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração” (Santos *et al.*, 2005) e ausência das bactérias patogénicas pesquisadas, durante os 8 dias de estudo.

Quanto à análise organoléptica, a avaliação efectuada pelo painel de provadores nos dias 1, 3 e 6 revelou resultados satisfatórios, enquanto que a avaliação sensorial efectuada no dia 8 revelou alguma alteração no atributo sabor, classificado como desagradável por 8% dos elementos do painel, e também no atributo textura, classificado como não característico por 20% dos elementos do painel.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a vida útil do bacalhau com natas submetido ao método “cook-chill”, e preparado de acordo com a Especificação Técnica que figura no Anexo I, poderia ser prolongada até aos 6 dias pós-fabrico, em vez dos 5 dias atribuídos pela empresa produtora. Mas seria imprescindível a realização de estudos semelhantes ao descrito a mais lotes fabricados de acordo com o referido método, para se poder aumentar, com segurança, a vida útil do referido produto. Ainda assim, e caso existisse interesse comercial em prolongar ainda mais a vida útil do bacalhau com natas “cook-chill”, dever-se-ia adicionar ao método “cook-chill” outras barreiras, nomeadamente a utilização de embalagem protectora.

Relativamente ao bacalhau com natas “cook-freeze”, e apesar das diferenças significativas ($p < 0,05$) encontradas nas contagens de microrganismos a 30°C entre os

0 e 4 meses e entre os 0 e 6 meses, as contagens nunca foram superiores a 10^2 UFC por grama de alimento limite superior do nível satisfatório de qualidade microbiológica para alimentos do grupo 1 (refeições prontas a consumir) considerado nos “Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração” (Santos *et al.*, 2005). Interessa ainda referir que ao contrário dos alimentos do grupo 1 do referido estudo, o bacalhau com natas do presente estudo ainda tem de ser regenerado antes do consumo, sofrendo assim um tratamento térmico eficaz antes de ficar pronto a consumir, o que desvaloriza a contagem de microrganismos a 30°C anteriormente referida.

Do ponto de vista organoléptico, não foram detectadas alterações dos atributos sensoriais avaliados no período proposto – 6 meses – pelo que seria útil prolongar o estudo por mais algum tempo, de forma a determinar o limite de estabilidade do bacalhau com natas submetido ao método “cook-freeze”.

Contudo, e independentemente dos resultados obtidos em estudos futuros, interessa determinar se existe interesse comercial em aumentar a vida útil do bacalhau com natas “cook-freeze” para além dos 6 meses, pois um aumento na vida útil de um alimento ultracongelado traduz-se num aumento dos custos associados ao armazenamento e a uma gestão logística mais fastidiosa.

Interessa ainda concluir acerca dos resultados obtidos na análise organoléptica. De facto, os elementos do painel de provadores não possuíam treino para o tipo de análise em questão, sendo influenciados por factores como o gosto pessoal e a hora da prova, pelo que os resultados obtidos são muito pobres e as conclusões tiradas da análise sensorial ficam aquém do desejável para um estudo deste tipo.

Portanto, para estudos futuros sobre a vida útil de alimentos será imprescindível realizar uma avaliação objectiva, que deverá incluir análises microbiológicas e físico-químicas.

As análises microbiológicas deverão incluir contagem de microrganismos a 30°C e a contagem de *Enterobacteriaceae*, que servirão de indicadores gerais de higiene do alimento. Quanto à pesquisa de microrganismos patogénicos, dever-se á ter em conta a análise de perigos efectuada ao alimento, e a pesquisa e/ ou contagem de microrganismos patogénicos, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.. A análise poderá também incluir a contagem de bolores e leveduras.

Relativamente à análise físico-química, esta deverá incluir um meio expedito de monitorização da temperatura ao longo do processo de fabrico e armazenamento e também a determinação do pH do alimento, a quantificação do ABVT, por ser um

importante indicador do grau de frescura alimentar e, nos alimentos ricos em lípidos a determinação do índice de TBA pode assumir particular importância, visto não ser inactivado pelo frio.

Quanto à avaliação sensorial, apesar de muito importante, está associada a dificuldades práticas consideráveis, nomeadamente a formação e manutenção de um painel de provadores treinado para provar um ou mais alimentos específicos e a necessidade de um espaço físico com características específicas que permita a realização das provas em condições controladas. Portanto, para que os resultados possam ser tratados objectiva e cientificamente, a análise sensorial deve ser realizada sob determinadas circunstâncias, cujos custos a tornam impraticável. Logo, a análise sensorial hedónica assume uma importância meramente comercial, mas ainda assim com procura crescente na indústria nacional.

Apesar da indústria alimentar estar ainda à procura de uma condição “mágica” que permita a obtenção da verdadeira vida útil do produto, até à data essa condição não é conhecida (Labuza, 2000). Mas a emergência da qualidade e segurança alimentares, assim como as disposições regulamentares e as necessidades de mercado, estimulam a investigação e a melhoria de metodologias analíticas e inovações tecnológicas, de modo a que a indústria consiga melhorar os seus estudos de vida útil.

9. BIBLIOGRAFIA

Anónimo (2006). Diário de Notícias, 19 de Outubro de 2006, pp. 16 – 18.

Almeida, O. R. (2006). Estabelecimento do prazo de validade de carne de porco embalada em atmosfera modificada: indicadores microbiológicos, físico-químicos e sensoriais. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Ciência e Engenharia de Alimentos. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. 99 pp.

Baptista, P., Venâncio, A. (2003). Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. 1ª Edição. Forvisão. Guimarães.

Barreto, A. S., Ferreira, M. C., Ouakinin, J. S., Ribeiro, A. M. (1998). Approaches to risk assessment of catering food by microbiological data. Proceedings of the 4th World Congress in Foodborne Infections and Intoxications. Berlin, Germany.

Barros, M. (2003). A época do bacalhau. Jornal Público, 21 de Dezembro de 2003, pp. 2-4.

Betts, G. D. (1996). Code of practice for the manufacture of vacuum and modified atmosphere packaged chilled foods. Guideline no. 11. Campden and Chorleywood Food Research Association, United Kingdom.

Boknaes, N., Jensen, K., Guldager, H., Osterberg, C., Nielsen, J. e Daalgard, P. (2002). Thawed chilled barents sea cod fillets in modified atmosphere packaging – application of multivariate data analysis to select key parameters in good manufacturing practice. Lebensm-Wiss. U-Technol., 35, pp.436 – 443.

Brown, T., Evans, J. A., James, C., James, S. J., Swain, M. V. (2006). Thawing of cook-freeze catering packs. Journal of Food Engineering, Volume 74, Issue 1, May 2006, pp 70-77.

Buchanan, R. L. (1993^a). Developing and distributing userfriendly application software. J. Ind. Microbiol., Vol. 12. pp. 251-255.

Buchanan, R. L. (1993^b). Predictive food microbiology. Trends Food Sci. Technol., Vol. 4. pp. 6-11.

Codex Alimentarius Commission (1999). Code of hygienic practice for refrigerated packaged foods with extended shelf life. CAC/ RCP 46.

Creed, P. G. (2001). The potential of foodservice systems for satisfying consumer needs. *Inovative Food Science & Emerging Technologies* 2 (2001) 219 – 227.

Corradini, M. G. e Peleg, M. (2007). Shelf-life estimation from accelerated storage data. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 37 – 47.

Dens, E. J. e Van Impe, J.F. (2001). The need for another type of predictive model in structured foods. *Int. J. Food Microbiology*, 64, 247-260.

Doyle, E. (2002). Survival and growth of *Clostridium perfringens* during the cooling step in thermal processing of meat products: a review. Food Research Institute, University of Wisconsin, United States.

Directiva 2000/13/CE, de 20 de Março de 2000, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* 109 (6/5/2000) pp. 29 – 42.

Duun, A. S., e Rustad, T. (2007). Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets. *Food Chemistry*, 1016, 10-18.

European Food Safety Authority (2005). Opinion of the Scientific Panel of Biological Hazards on the Request from the Commission related to *Clostridium* spp. in Foodstuffs. EFSA-Q-2004-009.

Evans, J., Russell, S., James, S. (1996). Chilling of recipe dish meals to meet “cook-chill” guidelines. *International Journal of Refrigeration*, Vol. 19, No. 2, pp. 79 – 86.

Fan, X., Niemira, B. A. e Sokorai, K. J. B. (2003). Use of ionizing radiation to improve sensory and microbial quality of fresh-cut green onion leaves. *Journal of Food Science*, 68, pp. 1478 – 1483.

Fennema, O. R., Powrie, W. D. e Marth, E. H. (1973). *Low temperature preservation of foods and living matter* (Vol. 76). Nova Iorque: Marcel Dekker.

Food Safety Authority of Ireland (2005). *Guidance note no. 18 – Determination of food shelf-life*. Dublin, Ireland.

Food Safety Authority of Ireland (2006). *Guidance note no. 15 – Cook-chill systems in the food service sector (revision I)*. Dublin, Ireland.

Foster, J. W. e Spector, M. P. (1995). How *Salmonella* survive against the odds. *Ann. Rev. Microbiol.* 49, 145 – 174.

Fu, B., Labuza, T. P. (2000). Shelf life testing: procedures and prediction methods for frozen foods, *J. Food Proc. Preserv.* (7), pp. 2- 46.

Fung, D. Y. C. (1998). Rapid methods and automation in microbiology. *Food Testing & Analysis* (3) 6, p.20.

Garitta, L., Gómez, G., e Curia, A. V. (2005). Metodología estadística de supervivencia. Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos. *Food Quality and Preference* (17), pp. 53 - 69.

Gaze, J. (2005). Microbiological aspects of thermally processed foods. *J. Appl. Microbiol.*, 98, pp. 1381-1386.

Geiges, O. (1996). Microbial processes in frozen food. *Adv. Space Res.*, Vol. 18, No. 12, pp. 109 – 118.

Gould, G. W. (1996). Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, 33, pp. 51 – 64.

Holdsworth, S. D. (2004). Optimising the safety and quality of thermally processed packaged foods. Improving the thermal processing of foods (1st Ed.). Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, England, pp. 3-31.

Hough, G. (2006). Sensory shelf-life testing. Food Quality and Preference, 17, pp. 640-645.

Hough, G., Langhor, K., Gomez, G. e Curia, A. (2003). Survival analysis applied to sensory shelf life of foods. Journal of Food Science, 68, 359 – 362.

Huis in't Veld (1996). General introduction to food spoilage. Int. J. Food Microbiology. 33, pp. 1-18.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1980). Microbial ecology of foods, Vol.I, Factors affecting life and death of microorganisms. Academic press, New york.

ISO 6579 (2002). "Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*" International Organization for Standardization.

ISO 11290-1 (1996). "Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*". International Organization for Standardization.

Labuza, T.P., Fu, Bin. (1997). Shelf Life Testing: Procedures and Prediction Methods. Frozen Food Quality, CRC Press, Denver.19, pp. 377-415.

Labuza, T. (2000). The search for shelf life – An update on continued efforts in understanding practical strategies for determining and testing the shelf life of food products. Food Testing Analysis, 5, pp.1-21.

Lee, S. Y. (2004). Microbial safety of pickled fruits and vegetables and hurdle technology. Internet Journal of Food Safety, Vol. 4, pp. 21-32.

Leistner, L., Gorris, L. G. M. (1995). Food Preservation by hurdle technology. Trends in Food Science and Technology, 6, pp. 41-46.

Ledauphin, S., Pommeret, D., Qannari, E. M. (2006). A Markovian model to study products shelf-lives. *Food Quality and Preference*, 17, pp. 598 – 603.

Li, C. T., Wick, M., Marriott, N.G. (1999). Evaluation of Lipid Oxidation in Animal Fat. *Research and Reviews: Meat. The Ohio State University Special Circular*, pp. 172-199.

Lightfoot, N. F.; Maier, E. A. (2003). *Análise microbiológica de alimentos e água – Guia para a garantia da qualidade*. Fundação Calouste Gulbenkian. Portugal. 284 p.

Malakar, P. K., Martens, D. E., Zwietering, M. H., Béal, C., Van ´t Riet, K. (1999). Modeling the interactions between *Lactobacillus curvatus* and *Enterobacter cloacae* II. Mixed cultures and shelf life predictions. *Int. J. Food Microb.*, 51, pp. 67-69.

Marth, E. H. (1998). Extended shelf life refrigerated foods: microbiological quality and safety. *IFT Status Summary. Food Technology*, 52 (2), pp.52.

McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T., Ratkowsky, D. A. (1993). *Predictive microbiology: theory and application*. John Wiley & Sons, 1st ed. pp. 1-86.

Mekalanos, J. J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174(1): 1–7.

Mossel, D. A. A., Struijk, C. B. (1991). Public health implication of refrigerated pasteurised (sous-vide) foods. *International Journal of Food Microbiology*, 13, pp. 187-206.

Nakashima, S. M. K., André, C. D. S.; Franco, B. D. G. M. (2000). Revisão: Aspectos básicos da microbiologia preditiva. *Braz. J. Food Technol.*, 3, pp. 41-51.

New Zeland Food Safety Authority (2005). *A guide to calculating the shelf life of foods*. Wellington, New Zeland.

NF V 01-003 (2004). *Hygiène et sécurité des produits alimentaires – Lignes directrices pour l’élaboration d’un protocole de test de vieillissement pour la validation de la durée de vie microbiologique*. Saint-Denis La Plaine ; AFNOR (2).

Nissen, H., Rosnes, J. T., Brendehaug, J., Kleiberg, G. H. (2002). Safety evaluation of “sous-vide” processed ready meals. *Letters in Applied Microbiology*, 35, pp. 433 – 438.

NP 1829 (1982). *Microbiologia Alimentar - Preparação da amostra para análise microbiológica*. IPQ, Lisboa.

NP 1995 (1982). *Microbiologia Alimentar – Regras gerais para a contagem de microrganismos a 30 °C*. IPQ, Lisboa.

NP 2079 (1989). *Microbiologia alimentar – Regras gerais para análise microbiológica*. IPQ, Lisboa.

NP 2307 (1987). *Microbiologia alimentar – Regras gerais para contagem de microrganismos psicrotróficos*. IPQ, Lisboa.

NP 3005 (1985). *Microbiologia Alimentar - Preparação das diluições para análise microbiológica*. IPQ, Lisboa.

NP 4137 (1991). *Microbiologia alimentar - Regras gerais para a determinação de *Enterobacteriaceae* sem revitalização. Técnicas do número mais provável (NMP) e de contagem de colónias*. IPQ, Lisboa.

NP 3441 (1990). *Carnes, derivados e produtos cárneos – Determinação do pH. Método de referência*. IPQ, Lisboa.

NP 3356 (1990). *Pescado – Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (T.B.A.). Método espectrofotométrico*. IPQ, Lisboa.

NP 1848 (1987). *Carnes, derivados e produtos cárneos – Determinação do teor de azoto básico volátil total. Método das células de Conway*. IPQ, Lisboa.

NP 4396 (2002). *Microbiologia alimentar – Regras gerais para contagem de *Escherichia coli*. Método corrente*. IPQ, Lisboa.

NP 4400-2 (2002). Microbiologia alimentar – Regras gerais para a pesquisa de *Staphylococcus aureus*. IPQ, Lisboa.

Paixão, M. J. (2005) Estudo Qualitativo sobre Percepções e Comportamentos Alimentares. Agência Portuguesa de Segurança Alimentar.

Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho , de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios.

Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho , de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios.

Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho , de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.

Regulamento (CE) n.º 2073/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho , de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios

Rodgers, S. (2004). Novel approaches in controlling safety of “cook-chill” meals. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (2004), 366 – 372.

Rybka-Rodgers, S. (2001). Improvement of food safety design of “cook-chill” foods. *Food Research International*, 34, 449 – 455.

Schmidt, K., Bouma, J. (1992). Estimating Shelf-Life of Cottage Cheese Using Hazard Analysis, *J. Dairy Sci.* 75: 2922-2927.

Santos, M. I., Correia, C., Cunha, M. I: C., Saraiva, M. M., Novais, M. R. (2005). Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Revista da Ordem dos Farmacêuticos* 64: 66-69.

Sprenger, R. A. (2002). Hygiene for management – focus on food safety. 9th Edition, pp. 132-145. Highfield Publications. Donfield, United Kingdom.

Taoukis, P. S., Labuza, T. P. (1989). Applicability of time temperature indicators as monitors of shelf life of food products. Journal of Food Science, pp. 54.

Tyrer, H., Ainsworth, P., Ibanoglu, S., Bozkurt, H. (2004). Modelling the growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in ready-to-eat meals. Journal of Food Engineering, 65, pp. 137 – 143.

Vasavada, P. C. (1997). Advances in pathogen detection. Food Testing & Analysis, 47, pp. 18-23.

Vestergaard, E. M. (2001). Building product confidence with challenge studies. Dairy Food Environ. Sanit. 21(3):pp. 206-209.

Websites consultados:

Institute of Food Safety and Technology

<http://www.ifst.org/site/cms/>

Acedido a 30 de Julho de 2007

Coordenação Executiva de Cooperação Universitária e de Actividades Especiais da
Universidade de São Paulo

<http://www.cecae.usp.br>

Acedido a 8 de Agosto de 2007