



***Validação do Processo de Esterilização de Refeições
Prontas a Comer Enlatadas***

Anabela dos Santos Almeida



***Validação do Processo de Esterilização de Refeições
Prontas a Comer Enlatadas***

Anabela dos Santos Almeida

Relatório de estágio para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da Qualidade e
Segurança Alimentar

Relatório de estágio de Mestrado realizada sob a orientação da Professora Doutora Maria
Manuel Gil

Título: *Validação do Processo de Esterilização de Refeições Prontas a Comer Enlatadas*

Copyright © Anabela dos Santos Almeida

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2012

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTO

A conclusão do presente trabalho, não seria possível sem a ajuda e apoio de algumas pessoas que me acompanharam nas várias fases de elaboração da tese de mestrado. Desta forma quero agradecer:

a) À minha orientadora, Professora Doutora Maria Manuel Gil Figueiredo Leitão da Silva, pelos ensinamentos, disponibilidade, bibliografia cedida, interesse e amizade com que me acompanhou ao longo do trabalho;

b) À Gerência da Empresa D'Avó, pela disponibilidade que me concederam para eu assistir às aulas e efetuar os ensaios na empresa e no IPL, em especial aos colegas Paulo Marcelino e Francisco Gomes que colaboraram nos ensaios;

c) Ao técnico de eletromecânica industrial, Fernando Soveral, pela sua disponibilidade para efetuar a programação dos autoclaves com os processos de esterilização realizados;

d) Aos técnicos de laboratório da ESTM que me apoiaram no que foi necessário ao longo do tempo;

e) Às colegas Ana Faria, Ana Raquel, Cátia Veles e Rita Sousa por todo o apoio no trabalho de laboratório, e a todos os amigos que me acompanharam e apoiaram;

f) À Professora Maria José Rodrigues pela ajuda nas provas de microbiologia;

g) À Professora Susana Mendes pela ajuda no tratamento estatístico;

h) E, finalmente, à minha família, pelo apoio incondicional, incentivo e grande amizade e em especial à minha filha Margarida que sentiu muito a minha ausência durante a realização do mestrado.

RESUMO

A D' Avó – Indústria de Produtos Alimentares, Lda., é uma empresa com sede no Bombarral, que tem neste momento, como única atividade a comercialização e produção de refeições tipicamente portuguesas prontas a comer enlatadas (Dobrada com Feijão, Feijoada à Transmontana, Chispalhada, Sopa da Pedra e Chouriço com Feijão). Fundada em 1993, a empresa que inicialmente se dedicava à confeção de vegetais e frutas enlatados, sempre teve uma preocupação em acompanhar a evolução tecnológica e do mercado, o que se refletiu no desenvolvimento de novos produtos e consequente aumento da produtividade. Uma vez que se trata de produtos apertizados, o processo de conservação utilizado é a esterilização, processo este que foi iniciado na empresa, com base no conhecimento adquirido por colaboradores que já tinham trabalhado na indústria das conservas de pescado. No entanto, as condições do processo de esterilização nunca foram validadas para este tipo de refeições, desconhecendo-se assim se as condições utilizadas no processo são as mais apropriadas, em termos de segurança do produto, e mais vantajosas para a empresa em termos de gasto do consumo energético.

Neste trabalho o processo de esterilização da Dobrada com Feijão pronta a comer enlatada, foi estudado numa gama de temperaturas de 121°C e 123°C com o tempo a variar de 30 a 45 minutos, para avaliar o efeito do processo de esterilização na esterilidade do produto, bem como, nas propriedades sensoriais e no teor de proteína. Foi também efetuada a validação do processo de esterilização que a empresa utiliza na sua produção e os dados foram comparados com os dados obtidos nos processos estudados.

Foram testados quatro perfis de temperatura: (i) o aquecimento foi controlado de modo a que o autoclave siga uma rampa de aquecimento de 7,3°C/minuto durante 14 minutos, e em seguida se mantenha à temperatura de 121°C durante 45 minutos (Processo A), (ii) a temperatura do autoclave seguiu uma taxa de aquecimento de 6,57°C/minuto durante 9 minutos, e em seguida manteve-se 30 minutos a 123°C (Processo B), (iii) um terceiro, em que a temperatura do autoclave seguiu uma taxa de aquecimento rápido de 11,5°C/minuto, durante 8 minutos, e depois manteve-se a 123°C durante 40 minutos (Processo C), (iii) finalmente, um quarto, onde a temperatura do autoclave seguiu uma taxa de aquecimento, de 8°C/minuto durante 13 minutos, e manteve-se a 123°C, durante 45 minutos (Processo D). Registaram-se os valores de tempo, temperatura e pressão no interior do autoclave e no interior da lata (produto).

Para avaliar o efeito do perfil de temperaturas na esterilidade da Dobrada, efetuaram-se provas de estabilidade, esterilidade e colocaram-se indicadores biológicos com esporos de *Geobacillus stearothermophilus* no centro das latas testemunho. Foi também estudado o efeito do processo térmico no teor da proteína e nas características sensoriais do produto. Para a avaliação sensorial, realizou-se um teste discriminatório triangular, utilizando um painel treinado, para determinar se existem diferenças entre duas amostras.

Os processos C e D, demonstraram que exerceram efeitos de letalidade no indicador biológico com esporos de *Geobacillus stearothermophilus* utilizado, e que conferem estabilidade e esterilidade da Dobrada com Feijão. Estes resultados comprovam a eficácia da esterilização com estes processos.

Relativamente à qualidade organolética do produto destes processos C e D, a prova discriminativa triangular, revelou que os provadores não conseguiram encontrar diferenças significativas entre as amostras de Dobrada com feijão provenientes destes processos.

A nível do teor de proteína, verificou-se que o processo C apresenta diferenças significativas em relação aos processos A e B ($p < 0.05$). Quanto ao processo D, este não apresenta diferenças significativas ($p > 0.05$) em relação a nenhum dos processos estudados. Uma vez que o processo C, é o que apresenta valores de esterilização mais elevados no alimento (de acordo com os cálculos de F_{0al}), e mesmo assim, é o que apresenta maior teor de proteína, podemos concluir que os processos estudados não afetam o teor de proteína do alimento.

Assim, pode-se concluir que a utilização por parte da empresa do processo C ou D vai ser apenas uma questão de economia de tempo e de energia, uma vez que ambos os processos oferecem segurança do produto e não apresentam diferenças sensoriais perceptíveis.

Palavras-chave: Conservação, esterilização, valor F, esterilidade, estabilidade, *Geobacillus stearothermophilus*, pronto a comer, dobrada.

ABSTRACT

The D 'Avó - Industry Food Products Lda., is a company based in Bombarral, which at present has as the only activity the production and commercialization of typical Portuguese meals ready to eat canned (Folded with beans, Feijoada Transmontana, Chispalhada, Stone Soup, Chorizo and beans). Founded in 1993, the company that originally was dedicated to the confection of canned vegetables and fruits, has always been a concern to monitor the market and technological developments, which resulted in the development of new products and the resulting increase in productivity. Once it comes to products apertizados the conservation process is used the sterilization process which was started at the company, based on knowledge acquired by employees who had worked in the industry of canned fish. However, the conditions of the sterilization process has never been validated for this type of food, thus knowing whether the conditions used in the process are the most appropriate in terms of safety of the product, and more advantageous for the company in terms of spent energy consumption.

In this work the sterilization process of folded bean ready to eat canned was studied in a temperature range of 121 ° C and 123 ° C over time to vary from 30 to 45 minutes, to evaluate the effect of the sterilization process the sterility of the product and As in the sensory properties and protein content. It was also performed to validate the sterilization process that the company uses in its production and the data were compared with data obtained in the processes studied.

We tested four temperature profiles: (i) heating was controlled so that the autoclave follow a ramp heating of 7.3 ° C / minute for 14 minutes, and then is maintained at a temperature of 121 ° C for 45 minutes (Process A), (ii) the temperature of the autoclave followed by a heating rate of 6.57 ° C / min for 9 minutes and then kept 30 minutes at 123 ° C (Process B), (iii) a third, in which the temperature of the autoclave followed a rate rapid heating 11.5 ° C / minute for 8 minutes, then held at 123 ° C for 40 minutes (Process C) (iii) finally a room where the temperature of the autoclave followed by a rate heating from 8 ° C / minute for 13 minutes, and kept at 123 ° C for 45 minutes (Process D). There have values of time, temperature and pressure inside the autoclave and inside the can (product).

To evaluate the effect of temperature profile on the sterility of Folded, tests were made in stability, sterility and placed biological indicators with spores of *Geobacillus stearothermophilus* spores at the center of the cans witness. It was also studied the effect of thermal processing on the protein content and sensory characteristics of the product.

For sensory evaluation, there was a triangular discriminating test using a trained panel, to determine if there are differences between two samples.

The processes C and D show that lethality effects exerted on biological indicator with spores of *Geobacillus stearothermophilus* used, and which provide stability and sterility of the folded beans. These results prove the effectiveness of sterilization using these profiles.

Regarding the quality of the product these processes C and D, proof discriminative triangular, revealed that the tasters could not find significant differences between the samples from these beans with Folded processes.

The level of protein, it was found that the process C has significant differences when compared to the processes A and B ($p < 0.05$). As for the process D, this presents no significant differences ($p > 0.05$) compared to none of the studied processes. Once the process C, is the one with higher values sterilization in food (according to the calculations of F_{0al}), and even then, is what has a higher protein content, we conclude that the cases studied did not affect the protein content of the food.

Thus, it can be concluded that the use by the company's process C or D will only be a question of economy of time and energy, since both processes offer safety of the product and do not differ sensory.

Keywords: Conservation, sterilization value F, sterility, stability, *Geobacillus stearothermophilus*, ready to eat, folded.

ÍNDICE

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTO	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	viii
1.INTRODUÇÃO.....	18
1.1.Empresa: D'Avó – Indústria de Produtos Alimentares, Lda	20
1.2.Produto: Dobrada com feijão.....	21
1.3.Esterilização.....	22
1.3.1.Binómio tempo-temperatura.....	23
1.3.2.Binómio tempo- temperatura e a degradação do alimento	26
1.3.3.Valor de esterilização	27
1.4.Cinética da destruição dos microrganismos pelo calor	30
1.5.Validação do processo de esterilização	32
1.5.1.Provas de Estabilidade e de Esterilidade.....	32
1.5.2.Indicadores Biológicos	33
2.JUSTIFICAÇÃO, OBJETIVOS E DESENHO EXPERIMENTAL	34
2.1.Enquadramento	36
2.2.Objetivos.....	36
2.3.Desenho experimental	37
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1.Materiais	42
3.1.1.Dobrada com Feijão	42
3.1.2.Reagentes e meios de cultura	42
3.1.3.Equipamentos.....	42
3.2.Métodos	43
3.2.1.Preparação da amostra e colocação das ampolas de <i>G. stearothermophilus</i>	43
3.2.2.Tratamento térmico.....	44
3.2.3.Prova de estabilidade.....	47
3.2.4.Prova de esterilidade.....	47
3.2.5.Teor de proteína.....	50
3.2.6.Análise Sensorial	50
3.2.7.Análise estatística	51
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1.Tratamento térmico - perfis de temperatura testados.....	54

4.2. Teste bioindicadores de esterilização.....	60
4.3. Prova de estabilidade e valores de pH.....	62
4.4. Prova da esterilidade	64
4.5. Teor de Proteína Bruta.....	64
4.6. Análise Sensorial	66
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	68
6. BIBLIOGRAFIA.....	72
7. ANEXOS.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Refeições em lata D'Avó. Fonte própria.	21
Figura 1.2 - Ingredientes da Dobrada com Feijão D'Avó. Fonte própria.	21
Figura 3.1 – Preparação das latas (enchimento). Fonte própria.	44
Figura 3.2 – Entrada das latas no esterilizador. Fonte própria.	46
Figura 4.1 – Perfil de temperatura e variação de pressão durante os diferentes processos de esterilização (A, B, C e D).	55
Figura 4.2 - Valores de pH da Dobrada com Feijão obtidos, para os diferentes processos de esterilização estudados (A, B, C).	63
Figura 4.3 - Teor de proteína bruta (%) \pm DP para as amostras em estudo.	65
Figura 4.4 – Resultados da prova triangular.	66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1 – Valor de F para os processos de esterilização (A, B, C e D). Sendo F_{0a} – F do autoclave e F_{0al} - F do alimento.....	57
Tabela 4.2 - Ampolas bioindicadores de esterilização.....	61
Tabela 4.3 – Respostas dos provadores à prova triangular realizada às amostras.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. Empresa: D'Avó – Indústria de Produtos Alimentares, Lda

A D' Avó – Indústria de Produtos Alimentares, Lda., iniciou a sua laboração em 1993 com a confeção de vegetais e frutos enlatados e em 2001 tomou a opção de mudar para a confeção de refeições tipicamente portuguesas enlatadas e esterilizadas. Utiliza um processo de fabrico tradicional, de forma a colocar no mercado pratos cozinhados sem adição de aditivos para a sua conservação. De entre a vasta gama de produtos que já produziu, atualmente os produtos mais solicitados são a Dobrada com Feijão, Feijoada à Transmontana, Chispalhada, Sopa da Pedra e Chouriço com Feijão (Fig.1.1). Sendo produtos apertizados, o processo de conservação aplicado é a esterilização, processo este que foi iniciado na empresa com base no conhecimento adquirido por colaboradores que já trabalharam na indústria das conservas, mas o qual não chegou ser validado para este tipo de produtos.

Nos últimos anos a D'Avó tem vindo a assistir a um aumento na procura das suas refeições, pela preferência e aceitação dos temperos que utiliza. Além disso, o consumo das refeições pré-preparadas tem aumentado entre os consumidores portugueses, não só porque a crise económica fez diminuir as refeições fora do lar, mas também porque os hábitos de consumo mudaram (Oliveira, 2012). O facto de se consumir uma refeição por menos de quatro euros, menos que ir a um restaurante e, por vezes, menos do que cozinhar em casa, pesa na decisão. Além disso, se recuarmos há pouco mais de uma década, facilmente encontramos uma dona de casa a cozinhar para o seu marido e filhos. Hoje podemos encontrar um homem a cozinhar só para ele próprio e a horas tardias. Rapidez e qualidade são as características que parecem estar associadas a este mercado (Oliveira, 2012).

Desta forma, e sempre com o objetivo de alcançar cada vez mais o reconhecimento da qualidade dos seus produtos e o cumprimento legal, é de extrema importância para a D'Avó a melhoria continua na segurança e qualidade dos pratos confeccionados, bem como a validação do processo utilizado.



Figura 1.1 – Refeições em lata D'Avó. Fonte própria.

1.2. Produto: Dobrada com feijão

De todos os produtos que a empresa comercializa, a Dobrada com Feijão é o produto com maior procura por parte dos seus clientes, sendo o que apresenta o maior número de unidades vendidas por ano. Este facto pode ser justificado, pelo trabalho que a preparação caseira envolve e/ou pelo desconhecimento do método de confeção. A falta de tempo para cozinhar pode ser outro dos motivos na altura de optar por este produto. Este tipo de oferta ajuda a ganhar tempo, a olhar o ato de comer com outros olhos, a par de ser uma refeição equilibrada e justa no seu preço (Oliveira, 2012).

Conservar em lugar seco e fresco.
Keep in a col dry place.
Conservar sur un local frais.

DOBRADA COM FEIJÃO
Ingredientes: Feijão branco (36%), água de cozedura, dobrada de vaca (18%), chouriço de carne (2,4%), chouriço mouro (2,4%), cenoura (2,4%), amido, tomate, cebola, sal e especiarias.

STEWED TRIPE WITH BEANS
Ingredients: White beans (36%), water, tripe beef (18%), pork smoked sausage (2,4%), black pudding sausage (2,4%), carrot (2,4%), amid, tomato, onion, salt and spices.

TRIPES À LA PORTUGAISE
Ingrédients: Haricots blancs (36%), eau, tripes (18%), saucisson (2,4%), boudin (2,4%), carotte (2,4%), amide, oignon, sel et épices.

MODO DE PREPARAÇÃO:
Banho Maria: Abrir a lata e colocar em banho maria durante 29 minutos.
Micro-ondas: Colocar o conteúdo num recipiente adequado, tapar e aquecer durante 2 ou 3 minutos, dependendo da potência do aparelho.

PREPARATION:
Bowling water: Open the can and place it in a bolilling water for 20 miutes.
Micro-wave: Pour the content into an adequate recipient, cover it and warm it for 2 a 3 minutes, depending on the power of the Micro-waves

PRÉPARATION:
Bain-marie: Ouvrir la boîte et placer en bain-marie pendeant 20 minutes
Micro-ondes: Placer le contenu dans un récipient approprié, couvrir et chauffer pendant 2 ou 3 minutes, dependent de la puissance du micro-ondes

Peso Líquido:
Net Weight:
Poids Net:
420 g

PT
RPC-1233
CE

56034110001301

D'AVÓ - Indústria de Produtos Alimentares, Lda.
Zona Industrial, Lote 5 - 2540-050 Bombarral - Portugal
Tel.: +351 262 608 402 - Fax: +351 262 603 367 E-mail: davo.lda@sapo.pt

Consumir de preferência antes da data indicada no fundo da lata.
Best before: see boten; A consommer avant la date imprimée sous la boîte.

Figura 1.2 - Ingredientes da Dobrada com Feijão D'Avó. Fonte própria.

Sendo a Dobrada com Feijão o produto mais solicitado na empresa, foi selecionado como caso de estudo neste trabalho. Este produto tem como ingredientes: feijão branco, dobrada, chouriço de carne, chouriço mouro, cenoura e molho (água, amido de milho, tomate, cebola, sal e especiarias, sendo por isso um produto rico em proteínas (Fig.1.2).

A proteína é uma parte essencial da nossa dieta. As proteínas são substâncias encontradas em muitos alimentos e compostas por milhares de pequenas unidades chamadas aminoácidos. Os diferentes aminoácidos que compõem as proteínas são importantes para o crescimento do tecido de reparação e substituição. Carnes e peixes são boas fontes de proteína, no entanto, podemos também obter proteína ao consumir legumes, cereais, produtos lácteos, frutas, leguminosas e alguns vegetais (Silva *et al.*1988; Ricardo e Teixeira, 1992). No caso das refeições enlatadas, nomeadamente a Dobrada com Feijão a proteína encontra-se na dobrada, nos enchidos e no feijão. Sendo tão importante para a nossa dieta, o aporte de proteína por parte dos alimentos, é extremamente necessário que os processos de conservação utilizados não degradem o teor proteico do alimento conservado.

1.3. Esterilização

A deterioração microbiana dos alimentos e a presença de agentes patogénicos é um assunto de importância fundamental para as indústrias alimentares. Em termos de saúde pública, um controlo apropriado do crescimento e/ou inativação de microrganismos assume um papel crucial. Por outro lado, a ausência de contaminação por microrganismos que degradam parâmetros de qualidade é importante para a sua distribuição com a qualidade exigida e adequada (Gil, 2009).

De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESAs) e o Centro Europeu de Prevenção e Controlo (ECDC) o número de casos de intoxicação alimentar está a aumentar na União Europeia. Estes surtos estão normalmente associados com o consumo de carne, frutas frescas e saladas de vegetais e as principais causas dessas ocorrências são a manipulação inadequada dos alimentos, a aplicação de tratamentos térmicos ineficientes, bem como procedimentos de higiene inadequados. É pois, de importância inquestionável, o estudo de processos que permitam inativar microrganismos patogénicos. A aplicação de tratamentos térmicos eficazes, capazes de uma inativação adequada, é de importância fundamental. Estes tratamentos devem ser

projetados para fornecer uma margem adequada de segurança, contra riscos microbiológicos de intoxicação alimentar e deterioração de alimentos ao longo da vida de prateleira (Gil, 2009).

Nos métodos de conservação utilizados pela indústria alimentar, recorre-se a procedimentos físicos para aumentar a vida útil dos mesmos, utilizando a ação letal do calor para destruição dos microrganismos. A temperatura é provavelmente o fator ambiental mais importante que afeta o crescimento e a viabilidade dos microrganismos. Por este motivo, tratamentos térmicos são os mais aplicados a alimentos de forma a garantir a sua qualidade e segurança. A severidade do processo térmico depende obviamente do microrganismo conjugado com a natureza do alimento, o que origina com frequência a necessidade de controlo de fatores adicionais, tais como o pH e a atividade da água do meio (Pereda *et al.*1998).

No início do século 19, o confeitoiro francês Nicolas Appert desenvolveu o processo de esterilização de alimentos, por esse motivo, também denominado por “apertização”. Este processo consiste na exposição dos alimentos a altas temperaturas por um determinado período de tempo. Esse tempo pode ser longo (como no caso de alimentos enlatados) ou muito curto (em alimentos líquidos), no entanto terá que ser suficiente para a eliminação de todos os microrganismos que podem deteriorar o alimento ou causar problemas de saúde pública (Silliker *et al.* 1980). O objetivo da esterilização é assim, garantir a esterilidade comercial do alimento, permitindo desta forma, que este possa ser armazenado à temperatura ambiente, por um longo período de tempo (entre 2 a 5 anos, dependendo da composição do produto) sem desenvolvimento microbiano (Pereda *et al.*1998).

1.3.1. Binómio tempo-temperatura

Entre as várias operações a que são submetidas as conservas em recipientes fechados, a esterilização é, sem dúvida, a que requer um maior cuidado e atenção. A esterilização não depende inteiramente da temperatura máxima atingida por um alimento durante o processo, mas na combinação do tempo e da temperatura do processo. O binómio tempo - temperatura é indissociável e estudado por muitos autores para controlar, eliminar ou diminuir o número de microrganismos durante o processamento, manipulação e distribuição de alimentos para consumo (Banga *et al.* 1994; Teixeira e Tucker, 1997; Abdul Ghan *et al.* 2001; Mohamed, 2003; Rodríguez-Fernández *et al.*

2007). Existe uma relação entre o número de microrganismos, tempo de exposição e temperatura, que deve ser estabelecida para que se tenha segurança no processo e certeza da eliminação de microrganismos presentes nos alimentos. Este binómio tempo-temperatura é influenciado pela taxa de penetração de calor no alimento durante o processo (dependente da natureza do alimento, do meio em torno do alimento, do tamanho, da forma do recipiente e do tipo de processo ou de agitação), e pela resistência térmica dos microrganismos (Hallman e Stevens, 1932).

• Fatores que influenciam a penetração de calor

A transferência de calor do exterior do recipiente para o interior do produto ocorre por dois mecanismos: condução e convecção. A condução é o modo principal de transferir calor nos alimentos sólidos entre zonas a temperaturas diferentes. As partículas mais energéticas (situadas na zona de temperatura mais elevada) transmitem energia vibracional por contacto com as partículas menos energéticas que recebem essa energia. A convecção é o mecanismo de transferência do calor que ocorre num meio líquido ou gasoso, pelos movimentos ou correntes do líquido ou do gás. Estas correntes são provocadas pela dilatação térmica duma porção do líquido ou do gás que adquire assim uma densidade inferior àquela do fluido não aquecido, e tem, conseqüentemente, tendência a subir. Daí resulta uma movimentação enérgica das partes líquidas que permite uma subida rápida da temperatura do conjunto do produto (Emanuele, 1946; Bejarano, 2001).

Desta forma, a natureza do alimento e o meio que o rodeia são muito importantes no que respeita à esterilização; efetivamente, nos produtos enlatados com uma proporção importante de líquido, a penetração do calor faz-se principalmente por convecção e o centro da lata atinge assim rapidamente a temperatura do autoclave. Pelo contrário, nos produtos pastosos ou produtos de consistência pesada que têm pouco líquido, como purés e patés, a transferência de calor, que só se pode fazer por condução, é muito mais lenta. Pode-se assim dizer que, o teor de humidade do alimento tem um grande efeito sobre a condutividade térmica, ou seja, a condutividade térmica diminui com a diminuição da humidade do alimento (Wang e Brennan, 1992).

Durante a esterilização de latas de conservas, o calor é transferido do meio de aquecimento (água ou vapor) para o alimento através de todas as paredes, e o ponto que demora mais tempo a aquecer (ponto de menor letalidade ou ponto crítico), é o centro

geométrico da lata, no caso dos alimentos fluídos, e o ponto situado a 1/3 do fundo da lata (localizado no eixo do cilindro, aproximadamente a 12-18 mm do fundo da lata), no caso dos alimentos sólidos.

Assim, é na temperatura do centro geométrico que se devem basear todos os estudos sobre esterilização. O tempo necessário à penetração do calor até ao centro da lata é tanto maior quanto maior for a distância entre esse ponto e a periferia da lata. Nas latas cilíndricas cuja altura é superior ao diâmetro, o tempo de penetração do calor até ao centro da lata é função do seu raio (o tempo necessário para aquecer os centros para uma determinada temperatura são proporcionais aos quadrados dos raios); nas latas cujo diâmetro é superior à altura, esse tempo é função da altura. Por outro lado, os recipientes com boa condutividade térmica (por exemplos: latas metálicas) permitem trocas de calor mais rápidas do que os recipientes maus condutores de calor (por exemplo: frasco de vidro). Para um dado produto alimentar o tempo necessário à esterilização será maior se forem utilizados frascos de vidro do que se forem utilizadas latas metálicas. Há que referir também que, em processos com agitação ou nos quais os recipientes são rodados durante os mesmos, a taxa de penetração de calor é aumentada nesse produto (exceto no caso de produtos sólidos). Além disso, a temperatura inicial do alimento também influencia a transferência de calor até ao centro da lata, uma vez que quanto mais baixa for, mais tempo demora até que o centro térmico do alimento atinja a temperatura do autoclave (Hallman e Stevens, 1932; Bejarano, 2001).

• Resistência dos microrganismos à temperatura e ao pH do alimento

Como referido anteriormente, a temperatura é provavelmente o fator ambiental mais importante que afeta o crescimento e a viabilidade dos microrganismos. A resistência térmica dos microrganismos depende de vários fatores tais como: tipo de microrganismo, a forma em que se encontra (vegetativa ou esporulada) e o meio onde o microrganismo se encontra, nomeadamente as características do alimento (como por exemplo o pH, a atividade da água e a composição em gordura, hidratos de carbono e sais). Nas bactérias esporuladas, as termófilas apresentam uma maior resistência ao calor do que as mesófilas. Em termos de morfologia os cocos são habitualmente mais resistentes do que os bacilos e as bactérias Gram positivas mais do que as negativas. Relativamente às leveduras e aos bolores, ambos são bastante sensíveis à ação letal do calor, sendo os esporos destes também mais resistentes que as formas vegetativas (Miller, 2009).

O pH é um dos fatores que tem uma forte influência na resistência térmica das bactérias. Verifica-se que, para meios com pH de cerca de 6,0, a resistência térmica é máxima. À medida que o pH diminui, a sensibilidade do microrganismo à temperatura aumenta. Por outro lado, a formação de esporos por parte das bactérias está dependente do valor de pH do alimento. São considerados alimentos não ácidos alimentos com $\text{pH} > 4,5$ e alimentos ácidos alimentos com valor de $\text{pH} \leq 4,5$. Os esporos de *Clostridium botulinum* não conseguem germinar em alimentos com pH inferior a 4,5 e em alimentos com pH inferior a 4,0 nenhum esporo bacteriano consegue germinar. Assim de acordo com o pH do alimento pode-se diminuir consideravelmente a intensidade do tratamento térmico para conseguir a estabilidade microbiológica (Pereda *et al.* 1998; Silliker *et al.* 1980).

1.3.2. Binómio tempo- temperatura e a degradação do alimento

É necessário ter presente que, excedendo-se o tempo ou a temperatura da esterilização, se continua a obter resultados seguros em relação à esterilização do produto. Mas, do mesmo modo que devemos estar atentos para que uma esterilização não resulte num processo insuficiente (em termos de destruição de microrganismos, pois poderia tornar os produtos impróprios para o consumo antes do tempo de vida útil), também por outro lado é necessário estimar o impacto do processo em termos da destruição dos fatores de qualidade. É pois, de importância inquestionável, o estudo de processos que permitam inativar microrganismos patogénicos, mas cuja destruição de fatores de qualidade seja minimizada. Caso contrário destruir-se-iam as características organolépticas dos alimentos, modificando de um modo irreparável o aspeto, o sabor, consistência e a cor.

A sensibilidade à temperatura é vulgarmente avaliada com base no parâmetro z (calculado através do inverso do declive das retas de variação de logaritmo de D versus temperatura), traduzindo o incremento de temperatura necessário para diminuir num ciclo logarítmico o valor de D . O valor D define o tempo necessário em minutos, para reduzir numa potência decimal ou 90% os microrganismos presentes no alimento, a uma temperatura letal determinada. Quanto maior o valor de z , menor a sensibilidade do patogénico/fator de qualidade em relação à temperatura. Segundo Wang, *et al.* (2003) a taxa de destruição de parâmetros de qualidade é menos dependente da temperatura do que a taxa de destruição dos esporos microbianos. Do mesmo modo Noronha (1999)

descreve que os fatores de qualidade dos alimentos apresentam valores de z superiores aos valores de z observados na destruição de microrganismos e seus esporos.

Deste modo, no sentido de maximizar a qualidade do alimento devem ser usados processos a altas temperaturas e baixos tempos de contacto num processo conhecido como HTST (high temperature short time).

Nos processos clássicos de aquecimento a maior degradação da qualidade do produto será observada à superfície dado ser aqui que o alimento estará sujeito a temperaturas mais altas por maiores períodos de tempo. Como consequência, para se conseguir alcançar a esterilidade comercial, a qualidade dos alimentos sólidos na superfície pode sofrer alguma degradação (Wang *et al.* 2003; Chalabi *et al.* 1999).

Assim, é de extrema importância o cálculo das temperaturas e tempos do processo de esterilização, a fim de alcançar os níveis de segurança de inativação microbiana (letalidade), de forma garantir a segurança da saúde pública, a qualidade nutricional dos alimentos e evitando a subutilização da capacidade da empresa, obtendo um melhor desempenho económico (Simpson *et al.* 2009). Um compromisso entre os dois critérios deve ser encontrado, embora seja geralmente aceite que a segurança microbiológica deve ser o objetivo principal e, conseqüentemente, os alimentos enlatados são geralmente sobre processados (Banga *et al.* 2010).

Para efetuar os estudos do binómio tempo-temperatura é necessário conhecer as sucessivas temperaturas a que o alimento fica sujeito, no ponto de aquecimento mais lento durante o processo de esterilização. Estas temperaturas são determinadas colocando termopares à superfície e no ponto crítico (Hallman, e Stevens, 1932). As latas testemunho do processo devem ser colocadas em diferentes pontos do esterilizador (Rebollo, 1998).

1.3.3. Valor de esterilização

O valor de esterilização (ou valor F) define-se como o tempo necessário, a uma temperatura definida constante, para reduzir a população microbiana presente num alimento até um nível desejado. Quando o valor de F se refere a $121,1^{\circ}\text{C}$ (temperatura de referência) é designado como F_0 .

Devido ao caráter perecível dos alimentos, para cada produto ou para cada produção, na prática não é possível efetuar as análises necessárias para determinar a carga microbiana, identificar os microrganismos presentes, isola-los, multiplica-los e determinar os seus parâmetros de cinéticos com a finalidade de avaliar depois com precisão em cada caso o valor F. Todo este estudo levaria muito tempo, de tal forma que quando se obtivessem os resultados já os alimentos estariam alterados. Assim na prática, utilizam-se os tratamentos térmicos normalizados calculados previamente, tendo em conta a carga microbiana normal que os alimentos podem conter e a resistência térmica de microrganismos recolhidos de conservas alteradas (Pereda *et al.* 1998). Para alimentos como a carne, leite, pescado e algumas hortaliças, é possível ter a presença do *Cl. Botulinum*, cujo valor de $D_{121.1^{\circ}\text{C}}$ é igual a 0.21 minutos (Pereda *et al.* 1998). Considerando-se uma taxa de destruição de 12, i.e., considerando que se pretendem obter 12D (reduções decimais), o valor de esterilização a 121°C (F_0) mínimo é de 2.52 minutos. Como o alimento pode conter microrganismos esporulados mais termorresistentes que o *Cl. Botulinum*, o tratamento térmico pode ser suficiente do ponto de vista de saúde pública mas insuficiente para conseguir a esterilidade comercial. Desta forma é necessário aumentar a intensidade do tratamento. Utilizando-se valores de F_0 superiores na ordem de 10-12 minutos, conseguem-se reduções de 7-8D correspondentes às formas esporuladas do microrganismo (*Cl. sporogenes* PA-3769, $D_{121^{\circ}\text{C}}=1.5$ minutos) considerado como referência, sempre que o produto processado se destina a ser comercializado em países de clima temperado onde as temperaturas estivais podem superar os $30-32^{\circ}\text{C}$. Se a comercialização do alimento esterilizado se destina a países com climas quentes, com temperaturas máximas superiores a $35-40^{\circ}\text{C}$, é necessário considerar a possibilidade de existir a presença de bactérias esporuladas termófilas, cuja termorresistência é superior à do *Cl. sporogenes*, *Cl. Botulinum* e de outras bactérias mesófilas. É o caso dos *G. stearothermophilus* e *Thermoanaerobacterium (Clostridium) thermosaccharolyticum* ($D_{121^{\circ}\text{C}}=4-5$ minutos) que não se multiplicam abaixo dos $33-36^{\circ}\text{C}$. Nestes casos aplicam-se valores de F_0 de 14-20 minutos, que originam reduções de 4-5D dos esporos destes microrganismos considerados como referência. Os valores de F_0 referidos anteriormente servem como referência para conhecer os tratamentos térmicos necessários para conseguir a esterilização comercial nos diferentes alimentos (Pereda *et al.* 1998; Bejarano, 2001). Para conseguir este grau de esterilidade nem sempre se utiliza a temperatura de referência de 121°C , as temperaturas utilizadas oscilam entre $115-150^{\circ}\text{C}$, sendo as mais baixas utilizadas no fabrico de alimentos apertizados (conservas) e as mais altas para

alimentos líquidos ou semilíquidos em fluxo contínuo seguido de embalagem asséptica (HTST).

Segundo o modelo de Bigelow o efeito da temperatura no valor de esterilização é expresso pela seguinte equação:

$$F_T = F_{T_{ref}} 10^{\frac{(T_{ref} - T)}{z}} \quad (1)$$

Sendo, T_{ref} o valor da temperatura de referência, $F_{T_{ref}}$ (min) o valor de F à temperatura de referência e z (°C) o número de graus Celsius necessários para modificar o valor de D por um fator de dez.

O valor de z das bactérias esporuladas costuma situar-se entre 7 e 12°C. A maioria dos autores, são da opinião que de uma forma geral se pode utilizar um $z = 10^\circ\text{C}$ (Pereda *et al.* 1998; Rebollo, 1998).

Sendo o esporo de *G. stearothermophilus* o mais resistente ao calor entre as espécies de bactérias aeróbias formadoras de esporos, este microrganismo é frequentemente utilizado como indicador biológico para avaliar ou selecionar processos de esterilização de alimentos (Gao *et al.* 2006; Iciek *et al.* 2008). O *G. stearothermophilus* é uma bactéria Gram-positivo, não patogénica, formadora de esporos que vive em ambientes com temperatura alta. Os esporos de *G. stearothermophilus* são até vinte vezes mais resistentes ao calor do que os esporos do *Cl. botulinum*. Esporos de *G. stearothermophilus* podem sobreviver a um processamento térmico de um produto comercialmente estéril e os problemas de deterioração ocorrem principalmente quando o alimento é armazenado a temperaturas superiores a 43°C por um longo período de tempo, como por exemplo, alimentos enlatados vendidos em máquinas sem climatização ou em climas tropicais. O crescimento de esporos de *G. stearothermophilus* origina deterioração com alteração azeda do cheiro e sabor do alimento, porque ocorre a produção de ácido sem gerar pouco ou nenhum gás. A baixa acidez de alimentos como carne, produtos da pesca, leite, legumes ou misturas de carne com vegetais pode-se dever ao desenvolvimento dos esporos de *G. stearothermophilus* devido a condições de armazenamento improprias (Viedma *et al.* 2009).

1.4. Cinética da destruição dos microrganismos pelo calor

Ao aumentar a temperatura desde a temperatura ótima de crescimento de um determinado microrganismo, este primeiro inibe-se, provocando-se de seguida lesões subletais no microrganismo, podendo ser ainda viável, mas incapaz de multiplicar-se (até que não se reparem as lesões) e, se a temperatura é suficientemente elevada, provoca inevitavelmente a morte. Pode-se assim dizer, de forma geral, que qualquer temperatura acima da máxima de crescimento de um microrganismo é letal para ele. Quando se aplica numa população microbiana, tratamentos térmicos com valores de temperatura letais para esses microrganismos, a população sofre um decréscimo contínuo e ordenado no seu número de microrganismos. Na curva de sobrevivência dos microrganismos, relaciona-se o logaritmo do número de microrganismos sobreviventes, relativamente ao tempo de exposição à temperatura letal aplicada (temperatura a que se reduz exponencialmente o número de microrganismos). Em 1920, quase há um século, foi demonstrada para as formas esporuladas de *G. stearothermophilus* e outros microrganismos causadores de alterações em conservas, que estas apresentavam no número de microrganismos, uma redução exponencial quando expostos a temperaturas letais contantes (Pereda *et al.* 1998; Silliker *et al.* 1980; Bejarano, 2001).

Segundo Noronha (1999) o número de microrganismos presentes numa dada suspensão quando esta é sujeita a diferentes tempos de aquecimento (a temperatura constante) permite concluir que a utilização de uma equação cinética de 1ª ordem descreve de um modo aproximado a evolução do número de microrganismos numa dada suspensão ao longo do tempo:

$$\frac{dN}{dt} = -K_T N \quad (2)$$

N – número de microrganismos; t – tempo (minutos); k_T - constante (constante cinética da reação, característica de um dado microrganismo para um determinado meio e dependente da temperatura) com unidades de tempo⁻¹.

Ao Integrar a equação 2, esta permite-nos chegar a uma expressão a qual nos permite calcular o número de microrganismos presentes numa dada suspensão de microrganismos (N_t) quando aquecida a uma temperatura constante por um dado período de tempo (t), dado o número inicial de microrganismos (N_0):

$$\ln N_f - \ln N_0 = -k_T t \quad (3)$$

equivalente a,

$$N_f = N_0 \cdot e^{-k_T t} \quad (4)$$

A taxa de destruição dos microrganismos é proporcional em cada instante, ao número de microrganismos presentes. Assim como ao longo do aquecimento o número de microrganismos (N) vai diminuir a taxa de destruição (número de microrganismos destruídos por unidade de tempo) vai necessariamente diminuir. Isto implica que quando o número de microrganismos se aproxima de zero a taxa de destruição também se aproxima de zero, isto é, nunca conseguimos atingir a destruição completa dos microrganismos (Noronha,1999).

Como referido anteriormente, o valor D representa o tempo necessário para a redução num décimo do seu valor do número de microrganismos de uma população, numa dada temperatura (T). Assim, a relação entre o valor de k e D é dada pela seguinte equação (Noronha,1999).

$$D_T = \frac{\ln 10}{k_T} \quad (5)$$

Acontece que em processos industriais não isotérmicos, em que a temperatura do processo não é constante ao longo do tempo e os valores de D e k são dependentes da temperatura, não é possível passar da Eq.2 à Eq.3 uma vez que o valor de k não é constante mas sim uma função da temperatura. Desta forma, quando consideramos casos em que há uma variação da temperatura ao longo do processo (considerando a temperatura observada no alimento visto ser esta a temperatura a que os microrganismos estarão sujeitos) teremos de considerar uma das seguintes equações para o cálculo da evolução do número de microrganismos (ou outro fator) ao longo do processo (Noronha,1999):

$$\frac{dN}{dt} = -k(T)N \quad (6)$$

Ou

$$\frac{dN}{dt} = - \frac{\ln 10}{D(T)} N \quad (7)$$

Em relação à dependência dos parâmetros cinéticos, com os fatores ambientais, segundo Miller *et al.* (2009) o modelo de Bigelow é o mais frequentemente utilizado, na descrição da dependência dos parâmetros cinéticos, com a temperatura:

$$D_T = D_{T_{ref}} 10^{\frac{(T_{ref} - T)}{z}} \quad (8)$$

Sendo, T_{ref} o valor da temperatura de referência e $D_{T_{ref}}$ (min.) o valor de D à temperatura de referência.

Este modelo tem sido utilizado com sucesso na indústria alimentar, na modelização da degradação térmica de microrganismos, enzimas e fatores de qualidade (Noronha, 1999).

1.5. Validação do processo de esterilização

1.5.1. Provas de Estabilidade e de Esterilidade

Para o controlo da eficiência do processo de esterilização, na indústria das conservas existem duas Normas Portuguesas, a NP 4404-1 2002 para a verificação da estabilidade e a NP 2309-2 1988 para a verificação da esterilidade dos alimentos esterilizados. Estas provas são utilizadas como prática corrente de medida controlo de qualidade dos lotes produzidos. Na prova de estabilidade as conservas são submetidas a várias temperaturas durante um período de tempo estabelecido, de forma a fornecer as condições ideais de temperatura para o possível desenvolvimento de microrganismos, que tenham sobrevivido ao processo de esterilização. Na esterilidade são feitas provas microbiológicas, utilizando meios de cultura adequados, para o possível desenvolvimento de microrganismos que tenham sobrevivido ao processo de esterilização. Nesta prova também é verificado o valor de pH, de forma a despistar qualquer desenvolvimento microbiano.

1.5.2. Indicadores Biológicos

O controlo da eficiência do processo de esterilização pode ainda ser mais rigoroso recorrendo-se a indicadores biológicos. Um indicador biológico consiste numa preparação de um microrganismo específico, resistente a um determinado processo de esterilização, que quando usado de forma adequada quantifica satisfatoriamente a eficiência do processo de esterilização, pela integração dos fatores letais de tempo e temperatura, sobre a população microbiana. Ele tem por função estabelecer, avaliar e monitorizar os parâmetros físicos do ciclo de esterilização para o equipamento definido, qualificar o nível de esterilidade alcançado e documentar a eficiência do processo (Gao *et al.* 2006; Iciek *et al.* 2008; Viedma, *et al.* 2009).

Uma vez reconhecidas as características de resistência térmica do *G. stearothermophilus*, este é utilizado por vários autores como indicador biológico em processos de esterilização (Gao *et al.* 2006; Iciek *et al.* 2008; Viedma *et al.* 2009).

Sendo necessário validar os processos de esterilização, quer na indústria alimentar, quer na indústria farmacêutica ou outras que utilizem a esterilização, existem no mercado ampolas para verificação da eficácia destes processos. Essas ampolas contêm um caldo nutritivo, açúcar, indicador de pH e esporos de organismos não patogénicos de *G. stearothermophilus* ATCC 7953 (esporulação otimizado). Estes esporos são completamente destruídos após 15 minutos, quando aquecido em vapor comprimido a uma temperatura de 121 ± 0.5 °C (245 KPa). Quando expostos a temperaturas mais baixas ou a menor tempo de exposição, um pequeno número de esporos pode sobreviver e ser capaz de crescer. Estas ampolas devem ser colocadas junto do lote de produto a ser esterilizado. Após a esterilização, a eficiência do processo é controlada pela incubação das ampolas a 55 ± 1 °C. Se a esterilização foi adequada, os esporos de *G. stearothermophilus* são eliminados e o conteúdo da ampola permanece cor violeta. Por outro lado se a esterilização foi inadequada ocorre o crescimento de *G. stearothermophilus* e o conteúdo da ampola muda para cor amarelo – laranja no prazo de 24 horas devido à formação de ácido, como resultado da fermentação dos açúcares e também torna-se turva devido ao crescimento microbiano.

2. JUSTIFICAÇÃO, OBJETIVOS E DESENHO EXPERIMENTAL

2.1. Enquadramento

A D' Avó – Indústria de Produtos Alimentares, Lda., é uma empresa com sede no Bombarral, que tem neste momento, como única atividade a comercialização e produção de refeições prontas a comer enlatadas tipicamente portuguesas (Dobrada com Feijão, Feijoada à Transmontana, Chispalhada, Sopa da Pedra e Chouriço com Feijão). O processo de conservação utilizado é a esterilização, processo este que foi iniciado na empresa com base no conhecimento adquirido por colaboradores que já tinham trabalhado na indústria das conservas de pescado. No entanto, as condições de processo nunca foram otimizadas para este tipo de refeições, desconhecendo-se assim se as condições utilizadas no processo são as mais corretas, em termos de segurança do produto, e mais vantajosas para a empresa em termos de gasto energético.

2.2. Objetivos

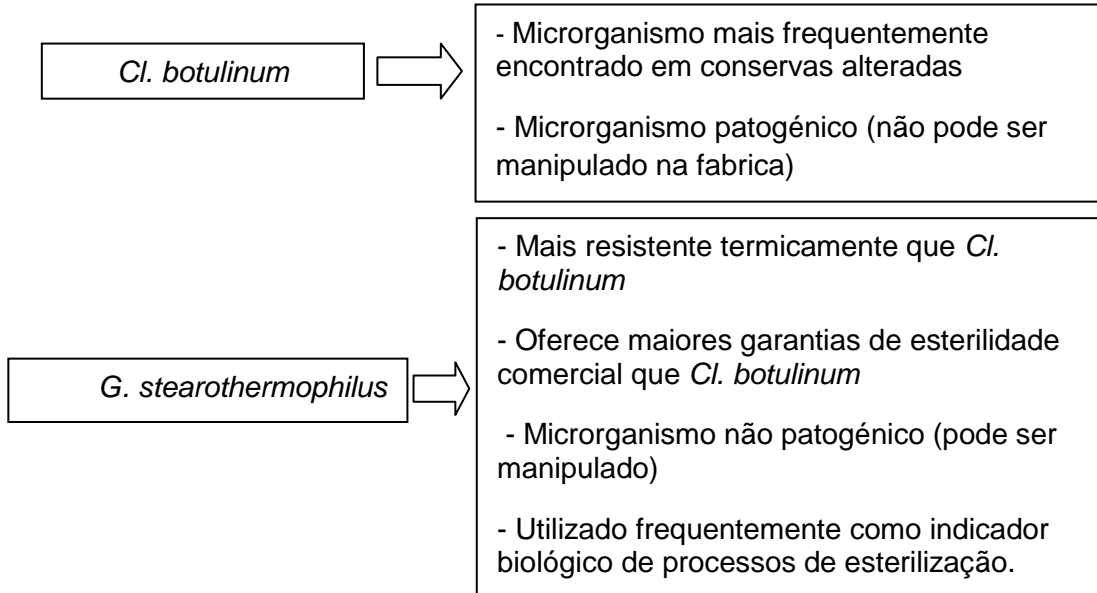
O objetivo principal deste trabalho foi a validação do processo de esterilização de refeições em lata produzidas na empresa D'Avó. Pretendeu-se verificar se o processo utilizado é o mais correto de forma garantir a segurança da saúde pública, a qualidade nutricional dos alimentos e a rentabilização da capacidade da empresa, obtendo um melhor desempenho económico.

Para alcançar este objetivo, seguiu-se os seguintes objetivos específicos:

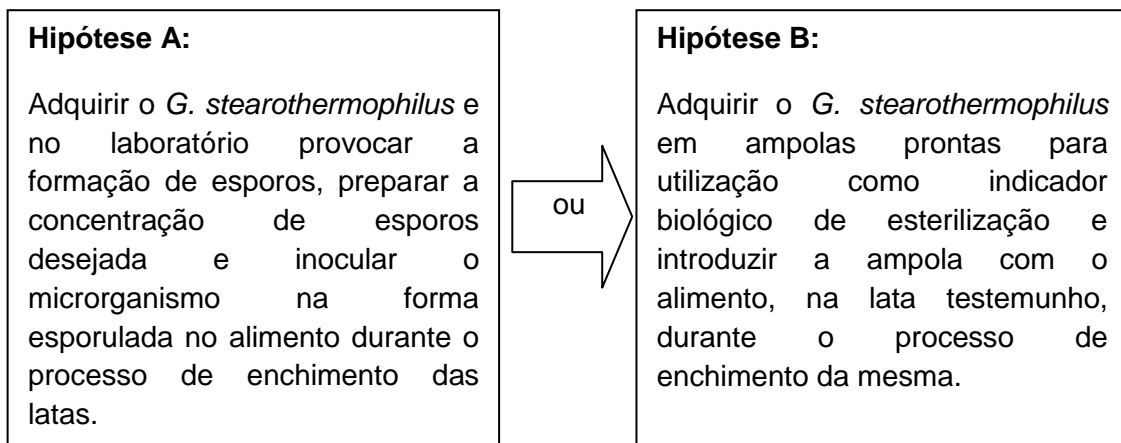
- Avaliar o efeito da aplicação de diferentes processos de esterilização (diferentes perfis de temperatura), na estabilidade e esterilidade do produto;
- Avaliar o efeito da aplicação de diferentes processos de esterilização (diferentes perfis de temperatura), na letalidade do indicador biológico com *G. stearothermophilus*;
- Avaliar o efeito da aplicação de diferentes processos de esterilização (diferentes perfis de temperatura), no teor de proteína do produto;
- Avaliar o efeito da aplicação de diferentes processos de esterilização (diferentes perfis de temperatura), nas características sensoriais do produto.

2.3. Desenho experimental

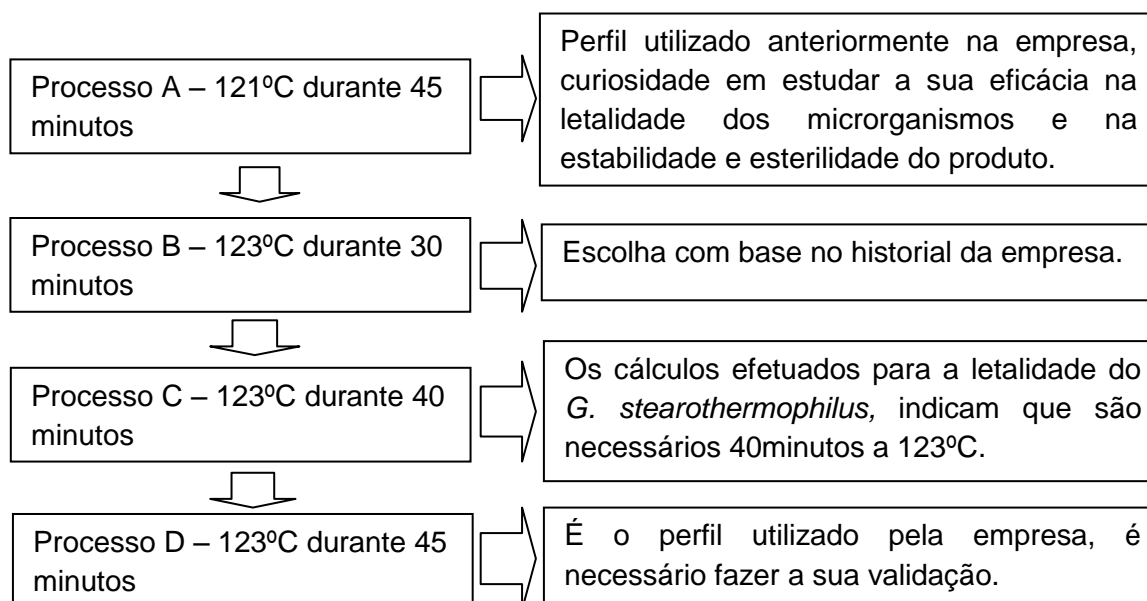
1ª Fase – Decisão sobre que microrganismo utilizar para validar o processo



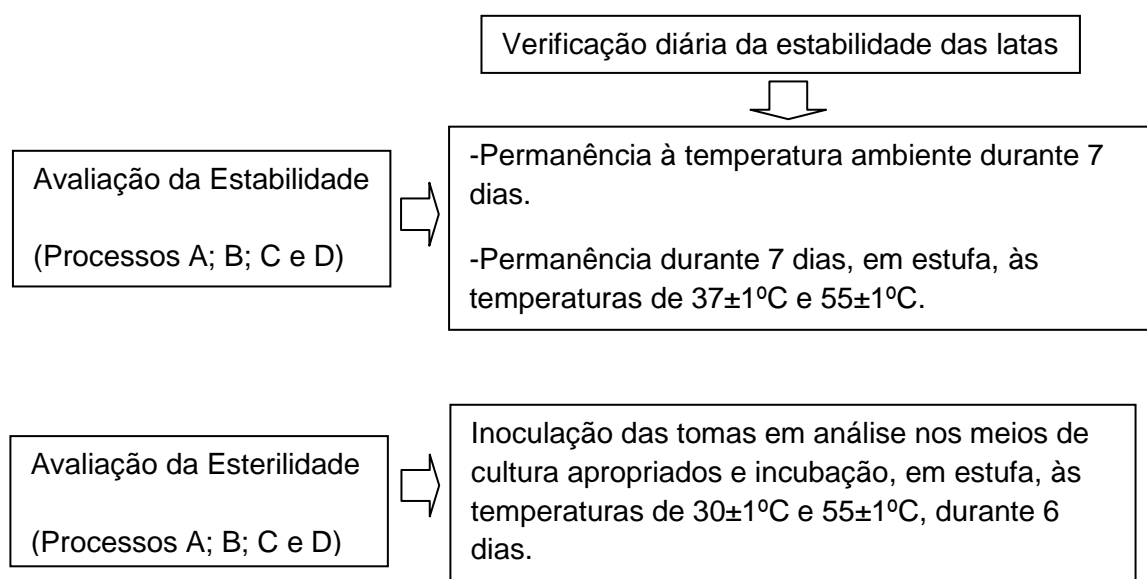
2ª Fase - Como colocar o microrganismo no alimento



3ª Fase – Definir quais os processos a testar



4ª Fase – Avaliação da estabilidade e esterilidade dos processos testados



5ª Fase – Avaliação do teor de proteína

Avaliação do efeito do processo no teor de proteína do alimento.

6ª Fase – Avaliação da análise sensorial por parte dos provadores treinados

Avaliação do efeito do processo nas características sensoriais do alimento, utilizando a prova discriminativa triangular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Dobrada com Feijão

A produção da Dobrada com Feijão em lata é efetuada na empresa D'Avó que está localizada na zona industrial do Bombarral. O produto Dobrada com Feijão é composto por: Feijão branco (36%), água de cozedura, dobrada de vaca (18%), chouriço de carne (2,4%), chouriço mouro (2,4%), cenoura (2,4%), amido de milho, tomate, cebola, sal e especiarias,

3.1.2. Reagentes e meios de cultura

Os reagentes e meios de cultura utilizados para as análises de laboratório, efetuadas neste trabalho, tinham grau de pureza p.a. e foram obtidos de várias fontes. Ácido bórico (Pronalab, Portugal); ácido clorídrico (Panreac, Espanha); ácido sulfúrico concentrado (Panreac, Espanha); etanol (Panreac, Espanha); vermelho de metilo (Scharlau, Espanha); hidróxido de sódio (EKA Chemicals, Portugal); Pastilha catalisador Kjeldhal (Scharlau, Espanha); Cloreto de sódio (Merck, Alemanha); Extrato de carne (Merck, Alemanha); Triptose (peptona trípsica de carne) (Merck, Alemanha); Dextrose (D-glucose) (Himedia, Brasil); Amido solúvel (Panreac, Espanha); Extrato de levedura (Scharlau, Espanha); Triptona (peptona trípsica de caseína) (Himedia, Brasil); Tioglicolato de sódio ($C_2H_3OH_2SNa$) (Biomérioux, França); L-cisteína ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$) (Sigma, Brasil); Resazurina (Biomérioux, França); Ágar-ágar (Merck, Alemanha); Triptose (peptona trípsica de carne) (Himedia, Brasil); Cloridrato de L-cisteína ($C_3H_8ClNO_2SH_2O$) (Sigma, Brasil); Água peptonada tamponada (Merck, Alemanha); Ampolas Sterikon plus Bioindikator (Merck, Alemanha).

3.1.3. Equipamentos

Neste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Esterilizador industrial (LAGARDE);
- Cravadeira industrial (Angelus);
- Sonda (EBRO LOGGER EBI IF100)
- Balança analítica (Explorer Pro – EP213, OHAUS (incerteza – 0.001 g));

- Destilador (Foss Kjeltec 2100, based on Tecator™ Techonology);
- Digestor (Digestor 2006 Foss, based on Tecator™ Techonology);
- Homogeneizador (*PiKatti 1705FL*, Flama)
- Homogeneizador (BAGMIXER 400);
- Destilador de água (Crysta, Aurora);
- Estufa (Binder);
- Estufa (memmert);
- Potenciômetro (INOLAB 720).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação da amostra e colocação das ampolas de *G. stearothermophilus*

O processo de produção das refeições em lata consiste na preparação prévia de todos os ingredientes e posteriormente a colocação dos mesmos na lata durante a passagem desta num tapete transportador (Fig. 3.1). Em primeiro lugar são colocadas as carnes previamente cozidas e cortadas, em seguida os enchidos em rodelas, o feijão previamente demolido e escaldado, e a cenoura em rodelas, por fim o molho que completa o enchimento da lata. Posteriormente a lata passa pela cravadeira onde é colocado o tampo, passa pela colocação de lote e validade e segue para a esterilização. A preparação das latas para a realização dos testes de esterilização foi efetuada durante o processo de produção da empresa. A lata que contém a sonda de leitura de tempo, temperatura e pressão foi preparada do mesmo modo. Todas as restantes latas foram retiradas da produção aleatoriamente.

Nas latas testemunho, foi efetuada a sua recolha da linha de produção antes da etapa da cravação e foi introduzida a ampola com o bioindicador contendo o *G. stearothermophilus* (Sterikon plus Bioindikator da Merck) de esterilização, em seguida voltaram a ser colocadas na linha para serem cravadas. Após o processo de esterilização as ampolas são incubadas a $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48h. Se a esterilização for adequada, os esporos de *G. stearothermophilus* são eliminados e o conteúdo da ampola permanece cor violeta. Por outro lado se a esterilização for inadequada ocorre o crescimento de *G. stearothermophilus* e o conteúdo da ampola muda para cor amarelo – laranja no prazo de

24 horas devido à formação de ácido, como resultado da fermentação dos açúcares e também torna-se turva devido ao crescimento microbiano. Em cada processo estudado foram utilizadas 3 ampolas, ou seja, 3 latas testemunho por processo.



Figura 3.1 – Preparação das latas (enchimento). Fonte própria.

Para cada processo foram preparadas 3 latas com indicador biológico, uma lata com a sonda de leitura e 21 latas de Dobrada com Feijão (7 latas para a prova de estufa a 37°C + 7 latas para a prova de estufa a 55°C + 7 latas para a prova à temperatura ambiente).

3.2.2. Tratamento térmico

A esterilização foi realizada num autoclave industrial horizontal estático de marca LAGARDE (Fig.3.2), o qual efetua os registos do tempo, da temperatura e da pressão, no seu interior durante a esterilização. Na lata foram registados os mesmos parâmetros, mas pela sonda introduzida no interior desta.

Efetuu-se o estudo de quatro perfis de temperatura:

Processo A - o aquecimento foi controlado de modo, a que o autoclave seguisse uma rampa de aquecimento de 7,3°C/minuto, durante 14 minutos, e em seguida manteve-se 45 minutos à temperatura de 121°C;

Processo B – a temperatura seguiu uma taxa de aquecimento de 6,57°C/minuto, durante 9 minutos, e em seguida manteve-se 30 minutos a 123°C;

Processo C – a temperatura do autoclave seguiu uma taxa de aquecimento rápido de 11,5°C/minuto, durante 8 minutos, e depois manteve-se a 123°C durante 40 minutos;

Processo D – este é o perfil que a empresa utiliza, e neste, a temperatura do autoclave seguiu uma rampa de aquecimento de 8°C/minuto, durante 13 minutos, e manteve a temperatura de 123°C, durante 45 minutos.

Registaram-se os valores de tempo, temperatura e pressão do interior do autoclave e do interior da lata (produto), no ponto de menor letalidade.

Os quatro processos referidos foram previamente estudados, e neste estudo considerou-se a temperatura de 123°C, a qual é superior à de referência. A razão da utilização desta temperatura foi porque é a temperatura que a empresa utiliza, e porque, segundo o princípio HTST (high temperature short time), os produtos submetidos a processos equivalentes (em termos de eliminação de microrganismos), com temperaturas mais elevadas e tempos mais curtos, têm melhor qualidade final. Neste estudo foram também considerados os valores de termorresistência do *G. stearothermophilus*, referidos na bibliografia.

Considerando que num processo de esterilização se pretende obter 12 reduções decimais, e que o valor $D_{121^{\circ}\text{C}}$ para o *G. stearothermophilus* é igual a 5 minutos (Pereda *et al.* 1998), o valor de esterilização requerido será:

$$\log \frac{N}{N_0} = -\frac{1}{D_{121}} F_{121}$$

$$-12 = -\frac{1}{5} F_{121} \quad (9)$$

$$F_{121} = 12 \times 5 = 60 \text{ minutos}$$

Se pretendermos utilizar uma temperatura superior, por exemplo 123°C, e sabendo que para o *G. stearothermophilus* $Z=11,7^{\circ}\text{C}$ (Segner *et al.* 1963), o valor de esterilização a esta temperatura, poderá ser calculado utilizando a equação de Bigelow:

$$F_T = F_{T_{ref}} \times 10^{\frac{(T_{ref} - T)}{z}} \quad (10)$$

$$F_{123} = 60 \times 10^{\frac{(121-123)}{11,7}} = 40,5 \text{ minutos}$$

Os resultados obtidos nos cálculos, permitiram encontrar os valores do processo C (40 minutos a 123°C) e permitem verificar que o processo D (45 minutos a 123°C), utilizado pela empresa, se encontra de acordo com os resultados obtidos pelos cálculos.

Relativamente ao processo A (121°C durante 45 minutos), os cálculos indicaram que este processo, não é suficiente para a letalidade do *G. stearothermophilus* à temperatura de 121°C. Foi efetuado o seu estudo, porque, os parâmetros de letalidade indicados nas recomendações de utilização das ampolas do bioindicador (contendo este microrganismo), eram inferiores aos do processo A. Além disso, o processo A era o processo utilizado anteriormente pela empresa e por esse motivo havia curiosidade em verificar, neste processo, o valor de esterilização no alimento, até porque, a temperatura que utiliza é a temperatura de referência.

No caso do processo B (123°C durante 30 minutos), além de os cálculos indicarem que à temperatura de 123°C o tempo que utiliza é insuficiente para a letalidade do *G. stearothermophilus*, também este processo, tem valores de tempo e temperatura superiores aos indicados, nas recomendações de utilização das ampolas do indicador biológico. Por outro lado, como referido anteriormente, pretendeu-se com este processo, verificar o princípio HTST (high temperature short time).



Figura 3.2 – Entrada das latas no esterilizador. Fonte própria.

3.2.3. Prova de estabilidade

A prova de estabilidade foi realizada de acordo com a NP 4404-1, 2002. Esta prova consiste em submeter as amostras a três temperaturas diferentes:

1. Foram colocadas 7 latas à temperatura ambiente (a sala estava a 21°C);
2. Foram colocadas 7 latas na estufa à temperatura de 37°C ± 1°C;
3. Foram colocadas 7 latas na estufa à temperatura de 55°C ± 1°C.

As amostras permaneceram sete dias em estufas às temperaturas estabelecidas, durante os quais foram inspecionadas diariamente para verificação de alterações externas tais como: opadas, frouxas ou com fugas.

Após os sete dias as amostras provenientes das temperaturas de 37±1°C e 55±1°C foram todas colocadas à temperatura ambiente (a sala estava a 21°C) para arrefecerem, posteriormente foi efetuado o exame exterior de todas as embalagens para verificação da existência de alterações externas.

Em seguida, às amostras que não apresentaram alterações exteriores, foi efetuado o exame ao conteúdo. Foi aberta uma lata de cada temperatura e verificadas as características organolépticas tais como o odor, cor e aspeto do produto. A cada uma destas amostras foi medido o pH, sendo que a diferença de pH deve ser inferior ou igual a 0.5 entre as unidades das três temperaturas para as amostras poderem ser consideradas estáveis.

3.2.4. Prova de esterilidade

A prova de esterilidade foi realizada de acordo com a NP 2309-2, 1988. Esta prova de esterilidade das conservas alimentares consiste na pesquisa de microrganismos que possam estar presentes. Para tal, e de acordo com a norma, foram preparados meios de cultura e efetuadas sementeiras, de várias porções do conteúdo das amostras, colhidas assepticamente. A incubação das sementeiras foi realizada às temperaturas de 30±1°C e 55±1°C, conforme descrição da norma referida.

Foram utilizadas as amostras da prova de estabilidade. Assim, efetuou-se a recolha de uma embalagem proveniente da prova de estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, para pesquisa de bactérias mesófilas e para a pesquisa de bactérias termófilas, foi recolhida uma embalagem proveniente da prova de estufa a $55\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Devido à heterogeneidade e espessura do alimento, efetuou-se a diluição e homogeneização do mesmo, de forma a obter amostras mais representativas do total do alimento. Assim procedeu-se da seguinte forma:

De cada amostra em análise foram retirados 100g de alimento tendo o cuidado que fossem representativos de todo o conteúdo, a estes foi adicionado 100g de água peptonada tamponada e homogeneizou-se a amostra no homogeneizador (BAGMIXER 400), obtendo-se assim uma solução mãe na razão de 1/1 (m/m).

Da solução mãe proveniente da lata submetida à prova de estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ foram efetuadas as seguintes sementeiras:

- (A) – semearam-se 3 tubos contendo o meio dextrose triptose amido, com 2cm^3 de inóculo;
- (B) – semearam-se 3 tubos contendo o meio de tioglicolato, com 2cm^3 de inóculo;
- (C) - semearam-se 3 tubos contendo o meio ágar dextrose triptose, com 0.2cm^3 de inóculo, utilizando ansa e esgotando todo o inóculo ao longo da superfície do meio;
- (D) - semearam-se 3 tubos contendo o meio extrato de carne e levedura, com 0.2cm^3 de inóculo, utilizando ansa esgotando o inóculo em espiral ao longo do meio de cultura.

Os tubos inoculados foram incubados em estufa a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 3 dias, após este período procedeu-se à repicagem:

1. Repicaram-se 3 tubos (A) contendo o meio de dextrose triptose amido, respetivamente, para 3 tubos contendo o meio de ágar dextrose triptose, utilizando ansa e esgotando todo o inóculo na superfície do meio;
2. Repicagem dos 3 tubos (B) contendo o meio de tioglicolato, respetivamente, para 3 tubos contendo o meio de ágar dextrose triptose, utilizando ansa e esgotando todo o inóculo na superfície do meio;

3. Repicagem dos 3 tubos (B) de meio de tioglicolato respetivamente, para 3 tubos contendo o meio extrato de carne e levedura, utilizando ansa e esgotando o inóculo em espiral ao longo do meio de cultura.

Os tubos de onde se repicaram as culturas e os tubos inoculados com a repicagem, foram a incubar 3 dias em estufa a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. A incubação dos tubos teve a duração total de 6 dias a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, considerando-se como crescimento positivo o aparecimento de colónias visíveis nos tubos com meio sólido e aparecimento de turvação ou colónias visíveis nos tubos com meios líquidos.

Da solução mãe proveniente da lata submetida à prova de estufa a $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ foram efetuadas as seguintes sementeiras:

(A) – semearam-se 3 tubos contendo o meio dextrose triptose amido, com 2cm^3 de inóculo;

(B) – semearam-se 3 tubos contendo o meio de tioglicolato, com 2cm^3 de inóculo;

(C) - semearam-se 3 tubos contendo o meio ágar dextrose triptose, com 0.2cm^3 de inóculo, utilizando ansa e esgotando todo o inóculo ao longo da superfície do meio;

(D) - semearam-se 3 tubos contendo o meio extrato de carne e levedura, com 0.2cm^3 de inóculo, utilizando ansa esgotando o inóculo em espiral ao longo do meio de cultura.

Os tubos inoculados foram incubados em estufa a $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 3 dias, após este período procedeu-se à repicagem:

1. Repicaram-se 3 tubos (A) contendo o meio de dextrose triptose amido, respetivamente, para 3 tubos contendo o meio de ágar dextrose triptose, utilizando ansa e esgotando todo o inóculo na superfície do meio;

2. Repicagem dos 3 tubos (B) contendo o meio de tioglicolato, respetivamente, para 3 tubos contendo o meio de ágar dextrose triptose, utilizando ansa e esgotando todo o inóculo na superfície do meio;

3. Repicagem dos 3 tubos (B) de meio de tioglicolato, respetivamente, para 3 tubos contendo o meio extrato de carne e levedura, utilizando ansa e esgotando o inóculo em espiral ao longo do meio de cultura.

Os tubos de onde se repicaram as culturas e os tubos inoculados com a repicagem, foram a incubar 3 dias em estufa a $55\pm 1^\circ\text{C}$. A incubação dos tubos teve a duração total de 6 dias a $55\pm 1^\circ\text{C}$, considerando-se como crescimento positivo o aparecimento de colônias visíveis nos tubos com meio sólido e aparecimento de turvação ou colônias visíveis nos tubos com meios líquidos.

3.2.5. Teor de proteína

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método de Kjeldahl (NP 1612; 2006). Este método começa por efetuar uma digestão às amostras (1g), com ácido sulfúrico concentrado, a quente, na presença de catalisadores, com o objetivo de converter o azoto orgânico em azoto mineral (ião amónia). Posteriormente, o azoto mineral sofre uma destilação por arrastamento de vapor para a libertação do amoníaco, com hidróxido de sódio a 40%, para uma solução de ácido bórico a 4% com indicador (vermelho de metilo). Esta solução será então titulada com ácido sulfúrico a 0,1M, numa titulação ácido-base por retorno, determinado o ponto de equivalência consegue-se quantificar o teor de proteína bruta:

$$F \times (V_2 - V_1) \times \frac{100}{m} \quad (11)$$

V_1 – o volume de solução de ácido sulfúrico 0.1M utilizado no ensaio em branco (ml); V_2 – o volume de solução de ácido sulfúrico 0.1M utilizado na determinação (ml); m – a massa da toma para análise (g); f (ácido sulfúrico) = 0.0028

Foi efetuada a determinação da proteína bruta nos quatro processos estudados. De cada processo foi retirada uma lata de amostra e realizadas 6 análises em cada amostra (4 latas de Dobrada com Feijão x 6 análises = 24 análises).

3.2.6. Análise Sensorial

Com o objetivo de realizar esta prova, selecionaram-se 9 provadores treinados, os quais são colaboradores da empresa habituados a provarem o produto com regularidade. São provadores capazes de detetar diferenças sensoriais entre produtos,

descrever e memorizar odores, sabores e texturas, compreender e seguir as instruções do teste.

Procedeu-se segundo a ISO 4120 (1983) para efetuar a prova discriminativa triangular, uma vez que se deseja comparar produtos com pequenas diferenças sensoriais. Esta prova consistiu em confrontar o provador com um exemplar de cada processo C e D (uma vez terem sido estes que demonstraram segurança alimentar). Elaborou-se um prato de prova, cada prato foi dividido em três partes iguais e em cada parte foi colocada uma amostra (2 amostras do processo D e uma do processo C) com os respectivos códigos aleatoriamente distribuídos. A cada provador foi distribuído um prato e uma folha de provas com a seguinte descrição: “ tem à sua frente três amostras de Dobrada com feijão D’Avó. Duas delas são da mesma esterilizações iguais e uma é de esterilização diferente das outras duas. Prove e selecione a amostra diferente”. Pediu-se que fosse indicado se encontrava diferenças, entre as amostras e que descrevesse as diferenças que encontrou (ver em anexo a Folha de Prova – Teste triangular).

A prova decorreu no refeitório da empresa durante a manhã, duas horas após o pequeno-almoço. Posteriormente foi realizada a interpretação dos resultados obtidos na prova.

3.2.7. Análise estatística

Foi efetuada a determinação da proteína bruta nos quatro processos estudados. De cada processo foi retirado uma lata de amostra e realizadas 6 análises em cada amostra (4 latas de Dobrada com Feijão x 6 análises = 24 análises), os resultados são expressos como médias \pm desvio padrão. Recorreu-se à análise de variância (ANOVA) pelo SPSS for Windows versão 18, para estudar o efeito do processo de esterilização sobre o teor de proteína. Foi considerado um nível significativo de confiança quando $p \leq 0,05$. Utilizou-se a tabela de número crítico de respostas corretas para o teste triangular (Tabela 7.5 em anexo), na análise dos dados relativos à prova discriminativa triangular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Tratamento térmico - perfis de temperatura testados

Um dos objetivos deste estudo foi o desenho do processo térmico de preservação de Dobrada com Feijão enlatada, considerando a carga e a resistência do microrganismo alvo (*G. stearothermophilus*). A eficiência do processo foi avaliada de modo a compreender os processos de conservação baseados na utilização de altas temperaturas. É necessário por um lado conhecer qual o efeito ou efeitos das altas temperaturas sobre os microrganismos e, por outro lado compreender os mecanismos básicos de transferência de calor do meio de aquecimento (água ou vapor de água) para os alimentos processados e no interior do próprio alimento, produzindo desta forma produtos alimentares seguros do ponto de vista da saúde do consumidor.

Foram considerados quatro perfis de temperatura: (i) um, em que o aquecimento foi controlado de modo a que o autoclave seguiu uma rampa de aquecimento de 7,3°C/minuto, durante 14 minutos, e de seguida manteve-se à temperatura de 121°C durante 45 minutos (Processo A); (ii) outro, em que a temperatura seguiu uma taxa de aquecimento de 6,57°C/minuto, durante 9 minutos, e em seguida manteve-se 30 minutos a 123°C (Processo B); um terceiro, em que a temperatura do autoclave seguiu uma taxa de aquecimento rápido de 11,5°C/minuto, durante 8 minutos, e depois manteve-se a 123°C, durante 40 minutos (Processo C); (iii) finalmente, um quarto, onde a temperatura do autoclave, seguiu uma taxa de aquecimento rápido de 8°C/minuto, durante 13 minutos, e manteve-se a 123°C, durante 45 minutos (Processo D).

Verificando os valores das rampas de aquecimento dos perfis de temperatura nos processos referidos, pode-se observar que o processo C teve a taxa de aquecimento mais rápida. Com os cálculos dos valores de F para o autoclave e para o alimento nos referidos processos, poder-se-á verificar se a rampa de aquecimento deste processo influenciou o valor de F no seu alimento.

Registaram-se os valores de tempo, temperatura e pressão do interior na autoclave e no interior da lata (fig. 4.1).

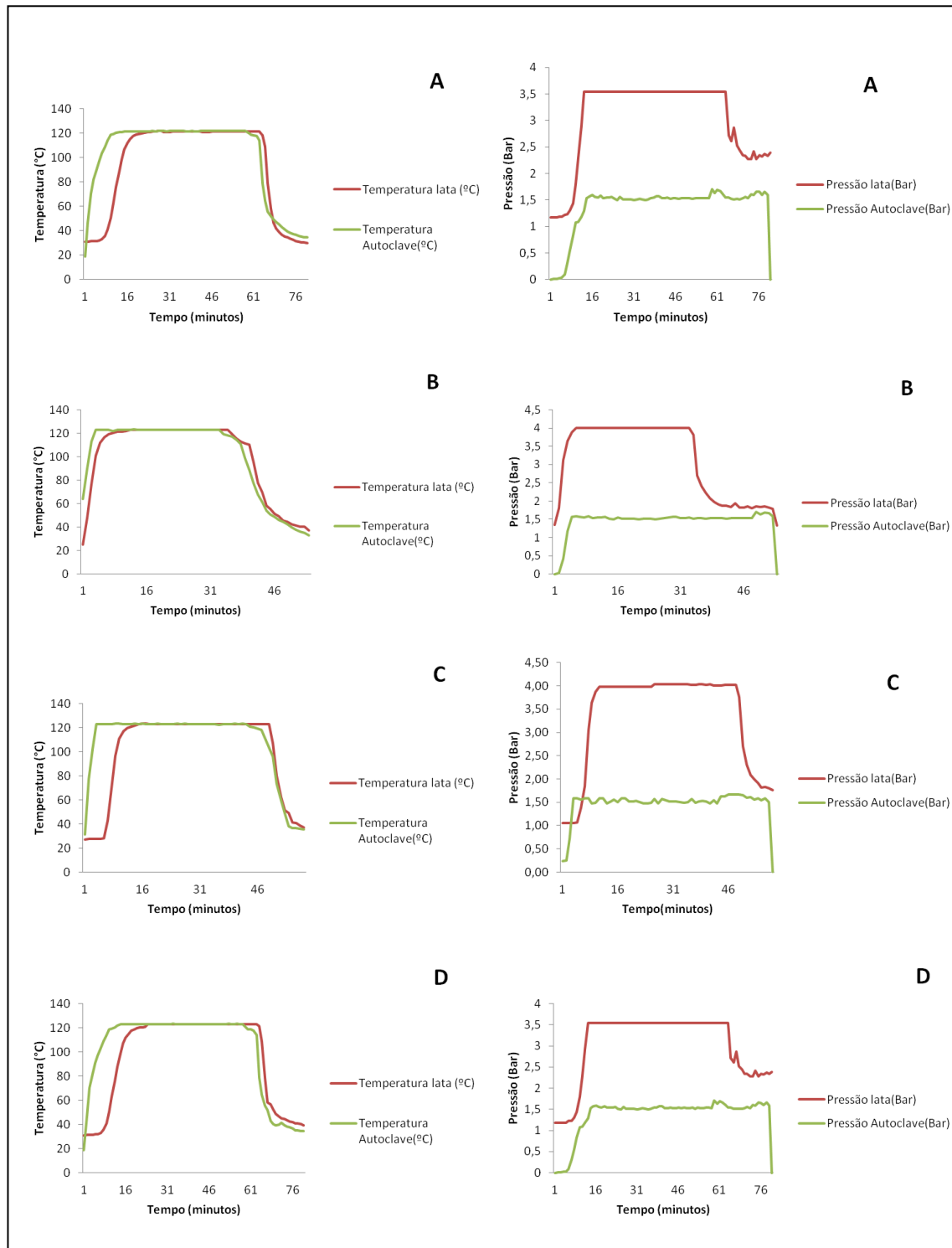


Figura 4.1 – Perfil de temperatura e variação de pressão durante os diferentes processos de esterilização (A, B, C e D).

Para além da avaliação do perfil térmico e da curva de pressão, é também necessário efetuar o cálculo do valor de esterilização de cada um dos processos (F_0), por forma a saber o impacto de cada processo na redução da população microbiana e por forma a ser possível a comparação do impacto entre os processos. Até porque, ao efetuar o cálculo do valor de esterilização de cada processo, estamos a incluir o CUT (come-up-time) que é o tempo que o processo demora a atingir a temperatura de esterilização pretendida. É importante considerar esta etapa do processo, uma vez que durante a subida da temperatura até ao valor pretendido, ocorre a letalidade de alguma parte da carga microbiana existente no alimento. Para tal, recorreu-se ao Método Geral:

Substituindo na equação 7, D_T pela equação 8 (descrita no ponto 1.4), e procedendo à integração da expressão resultante obtemos o seguinte resultado:

$$\ln N_f - \ln N_0 = - \frac{1}{D_{T_{ref}}} \int_0^{t_p} 10^{\frac{(T(t)-T_{ref})}{z}} dt \quad (12)$$

sendo, N_0 o número inicial de microrganismos, N_f o número de microrganismos presentes no final do processo e t_p (minutos) o tempo total de processamento.

A equação (12), permite-nos calcular o efeito de um dado processo de tempo-temperatura, $T(t)$, numa dada população de microrganismos, num tratamento térmico a temperatura constante.

A temperatura de referência é de 121,1°C. O valor de F será o número total de unidades de esterilização num tempo de um minuto, num processo à temperatura de 121,1°C. Para determinar o valor de esterilização (letalidade mínima requerida para o processo de esterilização a vapor saturado) F_0 , utilizamos os valores dos parâmetros cinéticos do *G. stearothermophilus* como referencia: $D_{121} = 5$ minutos (Pereda *et al.* 1998) e $Z = 11,7^\circ\text{C}$ (Segner *et al.* 1963), e procedeu-se aos cálculos (eq. 13):

$$F_0 = \int_0^{t_p} L dt = \int_0^{t_p} 10^{\frac{(T-121)}{z}} dt \quad (13)$$

Desta forma, para cada processo foram encontrados os valores de F utilizando os dados obtidos colocando o sensor dentro do autoclave (F_{0a}) e utilizando os dados obtidos colocando o sensor no ponto de menos letalidade do produto (F_{0al}) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Valor de F para os processos de esterilização (A, B, C e D). Sendo F_{0a} – F do autoclave e F_{0al} - F do alimento.

Processo	Valor de F		
	F_{0a}	F_{0al}	ΔF
A (121°C – 45 min)	58,3	49,7	8,6
B (123°C – 30 min)	46,6	43,0	3,6
C (123°C – 40 min)	62,4	55,5	6,9
D (123°C – 45 min)	64,6	51,2	13,4

Existem na literatura, diferentes valores de F_0 considerando o *G. stearothermophilus*, tais como: $F_0 = 12$ -15 minutos (Silliker et al. 1980), $F_0 = 14$ -20 minutos (Pereda et al. 1998) e), $F_0 = 24$ minutos (Ferrer et al. 2006). Estes estudos foram todos realizados em alimentos apertizados. Com base nos estudos efetuados por estes autores e com os valores de F_{0al} obtidos, nas quatro situações estudadas, era de esperar que o microrganismo fosse eliminado em todas as situações. No entanto, nos processos A e B isso não aconteceu. O facto de o alimento ser diferente, aos alimentos estudados pelos autores mencionados em cima, pode levar a que os parâmetros cinéticos do *G. stearothermophilus* sejam diferentes, e que o microrganismo tenha mais resistência ao calor.

Na tabela anterior, podemos verificar que o valor de esterilização com dados do perfil de temperaturas, obtidos na autoclave é muito superior ao valor de esterilização real, isto é, com dados obtidos colocando a sonda no ponto mais frio do alimento. Por exemplo, no processo A, o F_{0a} foi de 58,3 minutos, e para o alimento é F_{0al} foi de 49,7 minutos, existe uma diferença de 8,6 minutos de esterilização. Desta forma, ao considerarmos apenas o valor de esterilização do autoclave, corremos o risco do processo não ser suficiente para a letalidade do microrganismo.

No processo A, pretendia-se uma esterilização de 45 minutos a 121°C. Verificou-se que no interior do autoclave ocorreram as condições pretendidas, no entanto,

o interior da lata apenas registou a temperatura de 121°C durante 40 minutos. Ocorreu uma diferença de menos 5 minutos na esterilização à temperatura pretendida, da lata em relação ao autoclave.

Esta diferença no tempo de esterilização, entre o alimento e o autoclave à temperatura pretendida, reflete-se no valor de esterilização do alimento, como se verificou com o cálculo dos valores de F.

A razão pela qual o tempo de retenção no alimento foi menor em relação ao tempo de retenção do autoclave, deve-se à resistência à transferência de calor oferecida pelo alimento.

Esta resistência, dependente da natureza do alimento, sendo que a condutividade térmica diminui com a diminuição da humidade do mesmo (Wang, e Brennan, 1992), e depende da quantidade de água à sua volta. Nos alimentos colocados em líquidos (com molhos), a penetração do calor faz-se principalmente por convecção e o centro da lata atinge assim rapidamente a temperatura do autoclave. A resistência à transferência de calor é também influenciada pelo tamanho do alimento, pelo tipo e a forma do recipiente e do tipo de processo, como referido anteriormente (Hallman e Stevens, 1932).

No processo B, pretendia-se uma esterilização de 30 minutos a 123°C. A leitura dos registos do autoclave indicaram valores de temperatura a 123°C durante 30 minutos, e a sonda colocada no interior da lata registou valores de temperatura a 123°C durante 24 minutos. Verificando-se neste processo uma diferença de menos 6 minutos de esterilização à temperatura de 123°C, do interior da lata em relação ao autoclave. Por este motivo, o valor F_{0a} foi de 46,6 minutos e o F_{0al} foi igual a 43,0 minutos. Existe assim uma diferença de 3,6 minutos no valor de esterilização dependendo da posição da sonda.

Também neste processo, a razão pela qual a retenção no alimento foi menor em relação à autoclave, originando um valor de F_{0al} também menor, deve-se à taxa de penetração de calor no alimento durante o processo, a qual depende de vários fatores, como referido no processo anterior.

No processo C, pretendia-se uma esterilização de 40 minutos a 123°C. O autoclave registou valores de temperatura a 123°C, durante 40 minutos. A sonda colocada na lata registou a temperatura de 123°C durante 35 minutos. O interior da lata tem uma diferença em relação ao autoclave de menos 5 minutos de esterilização. Por este motivo, o valor F_{0a} foi de 62,4 minutos e o F_{0al} foi de 55,5 minutos, existe uma diferença de 6,9 minutos no valor de esterilização do alimento em relação ao autoclave.

O motivo pelo qual, se verificou uma retenção menor no alimento em relação ao autoclave, originando um valor de F_{0al} também menor, deve-se mais uma vez, à taxa de penetração de calor no alimento durante o processo, como descrito nos processos anteriores.

De todos os processos estudados o processo D é o que é utilizado na empresa. Neste processo, pretende-se uma esterilização de 45 minutos a 123°C. Verificou-se que o interior do autoclave registou a temperatura de 123°C durante 45 minutos. Em relação ao interior da lata verificou-se que esteve 40 minutos à temperatura de 123°C. Temos uma diferença de menos 5 minutos na lata em relação ao autoclave. Tal como nos processos anteriores, esta diferença origina diferenças nos valores de F calculados na autoclave e no alimento. O autoclave teve um valor F_{0a} de 64,6 minutos e o F_{0al} teve o valor de 51,2 minutos, existe uma diferença de 6,9 minutos de esterilização do alimento em relação ao autoclave.

O resultado do cálculo dos valores de F neste processo, permitiu-nos também verificar que o F_{0al} cujo valor foi de 51,2 minutos, é menor que o F_{0al} cujo valor foi de 55,5 minutos, no processo C. Seria de esperar que o F_{0al} do processo D fosse maior que o F_{0al} do processo C, uma vez que o tempo de esterilização foi maior para a mesma temperatura, e que o $F_{0a}=64,6$ minutos no processo D é maior que o $F_{0a}=62,4$ minutos do processo C. O processo C, foi o que apresentou a rampa de aquecimento mais rápida, e provavelmente este fator influencia o valor de F_{0al} , levando a que este seja maior. Outro motivo para este resultado ter ocorrido, deve-se ao facto do processo D ser o processo da empresa e como tal, o teste foi efetuado durante uma esterilização de um dia de produção normal. Por esta razão a esterilização foi realizada com a lotação do autoclave completa (2000 latas). Desta forma, para o cálculo dos processos a efetuar (F_0), há que ter em conta não só os valores cinéticos dos microrganismos, mas também as condições do processo, nomeadamente, a determinação da posição do termopar na aquisição do

perfil de temperaturas e também é importante ter em conta a lotação da autoclave (Rebollo, 1998).

Como referido nos processos anteriores, também no processo D, a diferença no valor de esterilização da autoclave em relação ao alimento, é originada, pela taxa de penetração de calor.

Há ainda que ter em conta, o tipo de equipamento utilizado, pois pode influenciar a transferência de calor no alimento. O facto de ser estático ou rotativo, pode diminuir ou aumentar a taxa de transferência de calor. Processos com rotação das latas, permitem a penetração de calor mais rápida até ao interior das mesmas (Hallman e Stevens, 1932; Rebollo, 1998).

4.2. Teste bioindicadores de esterilização.

Nas indicações de utilização do indicador biológico de esterilização, a letalidade dos esporos de *G. stearothermophilus* ocorre a 121°C durante 15 minutos, quando as ampolas são colocadas diretamente no autoclave. Um dos objetivos deste trabalho é confirmar a esterilidade do alimento no seu ponto de menor letalidade. Por este motivo, as ampolas foram colocadas dentro da lata, conjuntamente com o produto alimentar de modo a confirmar a esterilidade do alimento no seu ponto de menor letalidade. O resultado esperado é que a ampola teste permaneça violeta, e a ampola controle (ampola que não foi submetida ao processo de esterilização) fique amarelo. Isto indica que na ampola teste os microrganismos foram incapazes de se reproduzir, enquanto que, na ampola controle foram capazes de se reproduzir. Deduz-se assim que a esterilização foi efetiva.

Na tabela 4.2, podem observar-se os resultados obtidos para as ampolas incubadas (48h a 55±1°C) utilizadas nos diferentes processos testados e também das ampolas controle.

Tabela 4.2 - Ampolas bioindicadores de esterilização.

Cor das ampolas de <i>G. stearothermophilus</i> (3 unidades)				
Processo	Ampola 1	Ampola 2	Ampola 3	Ampola Controle
A	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
B	Amarelo	Violeta	Violeta	Amarelo
C	Violeta	Violeta	Violeta	Amarelo
D	Violeta	Violeta	Violeta	Amarelo

Podemos verificar que após a incubação, as ampolas utilizadas no processo A, mudaram para cor amarelo, indicando que os esporos de *G. stearothermophilus* não foram eliminados em nenhuma das ampolas e portanto o processo não é suficiente para garantir a esterilidade do produto.

Segundo Pereda *et al.* (1998) para eliminar esporos de *G. stearothermophilus* ($D_{121^{\circ}\text{C}}=4-5$ minutos) é necessário submetê-los a processos de esterilização cujo F_0 esteja compreendido entre 14-20 minutos. O valor de F_0 do processo A ($F_0= 45$ min) foi superior ao referido por este autor, no entanto, verificou-se que os esporos de *G. stearothermophilus* não foram eliminados em nenhuma das 3 ampolas utilizadas. Este facto pode estar relacionado com a resistência à transferência de calor oferecida pelo alimento e pela embalagem, pois o valor de F_0 obtido com os dados de temperatura do autoclave é diferente do valor de F_0 calculado com os dados obtidos no ponto mais frio do alimento, havendo neste caso necessidade de um processo mais longo para a temperatura de 121°C , ou um processo com duração igual ou menor, mas a uma temperatura superior a 121°C .

No processo B, das 3 ampolas utilizadas, em apenas numa se verificou que os esporos de *G. stearothermophilus* não foram eliminados. Também neste caso, se esperava que o indicador biológico não sobrevivesse, uma vez que, tanto a temperatura como o tempo do processo foram superiores ao indicado pelo autor, referido anteriormente. Verificando-se assim, que neste processo ainda não oferece a segurança pretendida. Este resultado pode ter ocorrido porque, a lata que continha o indicador biológico que não foi eliminado poderá ter sido colocada mais no centro do cesto de esterilização, e desta forma ter ficado mais protegida do processo, originando uma

penetração de calor mais lenta até ao seu ponto de menor letalidade e desta forma, nesta lata não se terem verificado os 30 minutos a 123°C no seu ponto mais frio (Hallman, e Stevens, 1932; Rebollo 1998). Comparando os valores de F_{0al} do processo A com o processo B, conclui-se que o processo A foi mais severo que o processo B, e neste caso nenhuma das ampolas do processo B deveria ter ficado estéreis como ficaram 2, este resultado pode ter ocorrido pelo facto da Dobrada com Feijão ter molho e assim as ampolas terem saído do ponto de menor letalidade da lata. Para combater este acaso ou incerteza deveria ter-se efetuado novo ensaio. No entanto não foi possível devido a restrições impostas pela empresa.

Nos processos C e D, todas as ampolas utilizadas apresentaram resultados positivos na eliminação dos esporos de *G. stearothermophilus*. Com estes resultados, estes processos apresentam segurança a nível do produto e da estabilidade comercial, ficando ambos aptos para a continuação do estudo.

4.3. Prova de estabilidade e valores de pH

Nas provas à temperatura ambiente ($\leq 25^{\circ}\text{C}$) e na prova de estufa à temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ não se verificaram alterações nas latas em nenhum dos processos durante o período em análise (7 dias). Além disso, não foram verificadas alterações no odor e no aspeto nas temperaturas referidas.

Na prova de estufa à temperatura de $55\pm 1^{\circ}\text{C}$, no processo A, ao quinto dia surgiram alterações na estabilidade em duas das latas, e no cheiro do produto das mesmas, revelando que este processo não permite a esterilidade comercial desejada do produto, comprometendo assim, a segurança do consumidor. Este resultado pode ter ocorrido devido a um eventual e pontual defeito da lata ou na cravação, que comprometeu a estanquicidade da embalagem, ou à sobrevivência de um eventual microrganismo termorresistente, uma vez que as alterações das latas só se verificaram quando estas foram submetidas à temperatura de $55\pm 1^{\circ}\text{C}$. Desta forma este processo foi eliminado do estudo por não apresentar a segurança pretendida.

Os processos B,C e D, na prova de estufa a $55\pm 1^{\circ}\text{C}$, apresentaram estabilidade nas embalagens e odor e aspeto característico do produto, ou seja, sem alterações.

Para confirmação da estabilidade das latas produzidas utilizando os processos B, C e D, foi efetuada a medição de pH às latas provenientes das provas de estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$, $55\pm 1^\circ\text{C}$ e temperatura ambiente, para verificação de diferenças nos valores de pH do alimento entre as 3 temperaturas. O resultado esperado, é que entre as unidades, a diferença dos valores de pH seja inferior ou igual a 0,5.

Existem bactérias termófilas formadoras de esporos, como é o caso do *G. stearothermophilus*, que são acidificantes e que não produzem gases quando se desenvolvem no alimento (Silliker *et al.* 1980). Desta forma, apenas a visualização da estabilidade das embalagens, não seria suficiente, uma vez que poderia existir este tipo de microrganismos no alimento, tornando-o alterado e impróprio para consumo, mas essa alteração não seria detetada pela observação da embalagem o por vezes do produto. Assim, com a medição do valor de pH entre as amostras é possível verificar a existência de alteração no alimento por parte destes microrganismos.

As medições realizadas às latas em termos de pH, encontram-se na figura seguinte:

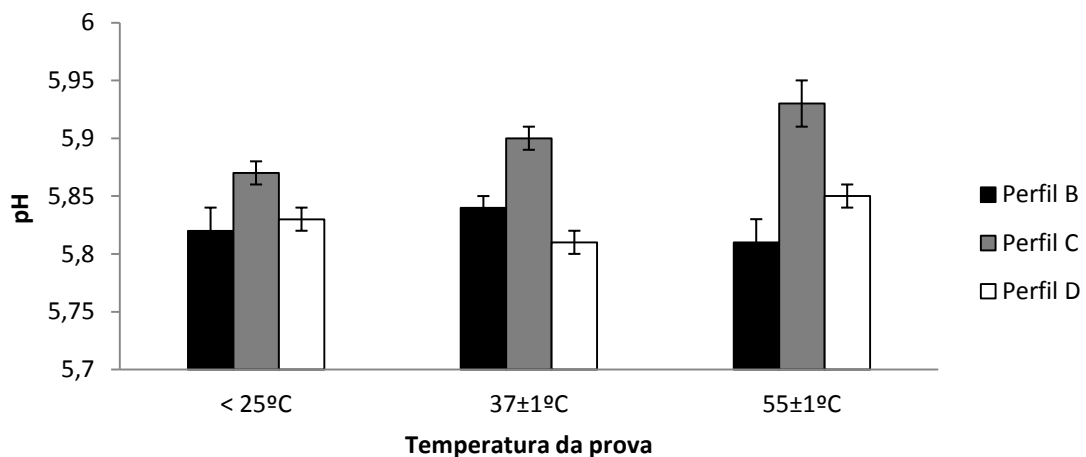


Figura 4.2 - Valores de pH da Dobrada com Feijão obtidos, para os diferentes processos de esterilização estudados (A, B, C).

Segundo a NP4404-1 (2002) as conservas são consideradas estáveis quando sujeitas à prova de estabilidade, se apresentam no decorrer desta, ausência de deformação na embalagem, ausência de modificações notórias do odor e do aspeto do produto em todas as unidades. E ainda, quando entre as unidades, a diferença dos

valores de pH é inferior ou igual a 0.5. Assim os resultados da prova obtidos para os processos B, C e D, cumprem com os requisitos da norma, podendo-se dizer que se encontram estáveis, e por isso, passaram à prova seguinte deste estudo, a prova da esterilidade.

4.4. Prova da esterilidade

Na prova de esterilidade as amostras obtidas no processo A, não apresentaram desenvolvimento microbiano quando incubadas a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, mas verificou-se crescimento nos tubos incubados a $55\pm 1^{\circ}\text{C}$, o que pode confirmar a presença de microrganismos termorresistentes. Esta prova elimina este processo, uma vez que não apresenta resultados de esterilidade.

Nas amostras obtidas nos processos B, C e D, não apresentaram crescimento microbiano em nenhuma das temperaturas de incubação ($30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $55\pm 1^{\circ}\text{C}$) dos tubos. Estes resultados indicam que nestes processos foram eliminados os microrganismos que existiam no alimento, uma vez as que os meios de cultura e as temperaturas de incubação utilizadas nesta prova permitem pesquisar a existência de microrganismos mesófilos e termófilos. Desta forma, e segundo a NP 2309-2 (1988) nestes processos podem-se considerar as latas estéreis.

4.5. Teor de Proteína Bruta

As proteínas são estruturas compostas por união de diversas moléculas de aminoácidos, através de ligações peptídicas. Uma perda da estrutura tridimensional é suficiente para causar a perda da sua função e assim ocorre a desnaturação. A desnaturação das proteínas altera-as afetando as características dos alimentos, mas muitas destas alterações não influenciam o seu valor nutricional. Um dos fatores que origina a desnaturação proteica é os processos de confeção dos produtos, nomeadamente as altas temperaturas utilizadas (Bos *et al.* 2000).

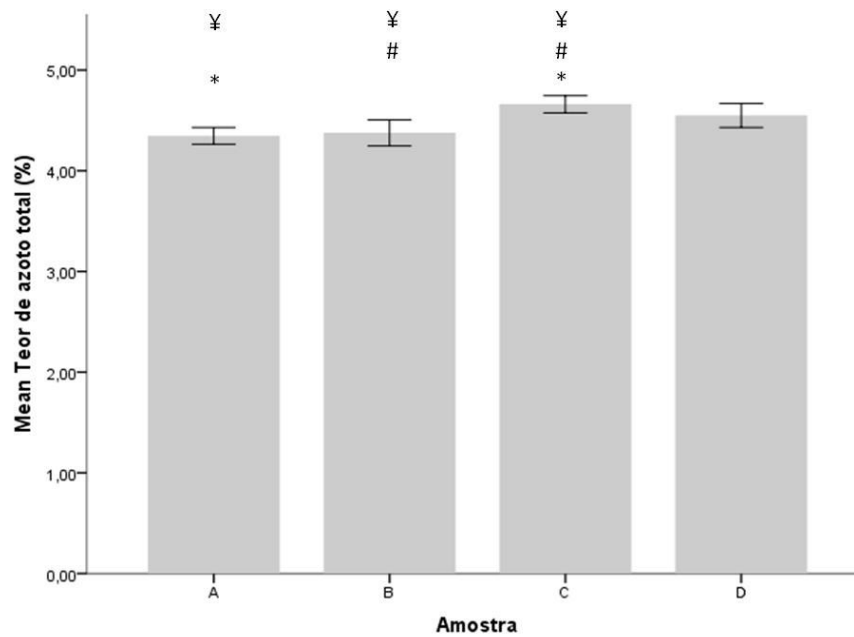


Figura 4.3 - Teor de proteína bruta (%) \pm DP para as amostras em estudo. O símbolo * indica diferenças significativas entre a amostra A e a amostra C ($p < 0,05$), o símbolo # indica diferenças significativas entre a amostra B e a amostra C ($p < 0,05$) e o símbolo ¥ indica diferenças significativas entre a amostra C e as amostras A e B ($p < 0,05$).

Pela análise da figura 4.3, verifica-se que existem diferenças significativas entre as amostras submetidas ao processo C e as amostras submetidas aos processos A e B ($p < 0,05$), o processo D não apresenta diferenças significativas em relação a nenhum dos processos estudados ($p > 0,05$). Sendo o processo C, o que apresenta valores de esterilização mais elevados no alimento (de acordo com os cálculos de F_{0al}), e mesmo assim, é o que apresenta maior teor de proteína, podemos concluir que os processos estudados não afetam o teor de proteína do alimento. As diferenças no teor de proteína observadas nos alimentos submetidos ao processo C podem-se dever ao fato do enchimento das latas ser manual e os pedaços de carne não serem exatamente homogêneos, pode nesta amostra ter sido colocado um pedaço de carne maior e desta forma originar maior valor de proteína em relação às amostras submetidas aos restantes processos.

4.6. Análise Sensorial

A análise sensorial permite determinar diferenças, caracterizar e medir atributos sensoriais dos produtos e ainda determinar se as diferenças nos produtos são detetadas e aceites ou não pelo consumidor (Gutierrez, 2009).

Com o objetivo de avaliar a existência de diferenças entre amostras submetidas aos procesos C e D, realizou-se uma prova triangular.

As provas triangulares são provas utilizadas para determinar diferenças sensoriais (não específicas) entre dois tratamentos. Ao provador são apresentadas três amostras codificadas, sendo-lhe indicado que uma delas é diferente das outras duas. É solicitada a identificação da amostra que é diferente. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 4.4:

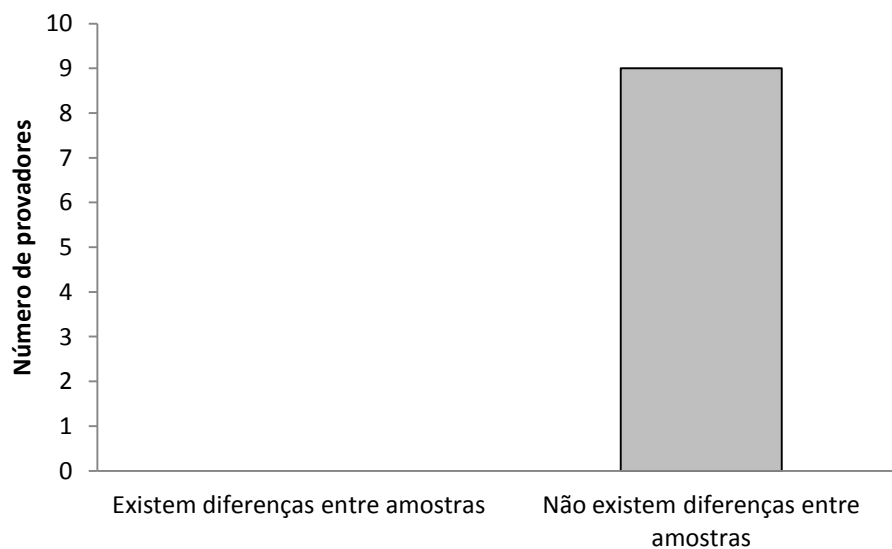


Figura 4.4 – Resultados da prova triangular.

Nesta prova, a probabilidade de um dado provador escolher ao acaso a amostra diferente é de 33,3% ou seja $1/3$. O problema que se coloca é saber, para um dado número de provadores, qual o número de respostas corretas a partir do qual podemos afirmar que existe uma diferença entre as amostras. O número de respostas corretas necessárias para se obter a diferença significativa a um dado nível de

significância pode ser obtido através da tabela 7.5 (em anexo). Os valores da tabela foram calculados utilizando a distribuição Binomial (Noronha, 2003).

A prova triangular apenas comparou amostras submetidas aos processos C e D, uma vez que, estes foram os que apresentaram resultados de segurança alimentar nas provas de esterilidade, estabilidade e letalidade do indicador biológico. As amostras submetidas aos processos A e B apresentaram resultados que colocavam em causa a segurança alimentar do produto e desta forma por em causa a saúde dos provadores.

Verificaram-se 9 respostas corretas (dos nove provadores que efetuaram a prova nenhum identificou diferenças entre as amostras, tabela 4.3), que ao serem comparadas com o nível de probabilidade da tabela 7.5 de números críticos de resposta (95%), verificamos que não existem diferenças significativas entre as amostras, uma vez que 9 é superior ao valor da tabela correspondente ao nível de significância 5%.

Tabela 4.3 – Respostas dos provadores à prova triangular realizada às amostras.

Número de Provadores	Respostas
3	Não encontro diferenças entre as amostras
4	As amostras são todas iguais
1	As amostras estão todas boas
1	Não existem diferenças entre as amostras

Podemos assim concluir que os processos (C e D), não apresentam diferenças sensoriais entre si, nomeadamente, cor, sabor, cheiro e textura. Estes resultados estão concordantes com o esperado, uma vez que os processos estudados não alteraram as características organolépticas do alimento.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

Conclusões

Dos quatro processos estudados o que obteve maior valor de esterilização foi o processo C, revelando-se desta forma o mais severo para o produto e com maior impacto na carga de microrganismos. No entanto, esta severidade não se traduziu numa diminuição das propriedades organoléticas e nutricionais em termos de proteína.

No que diz respeito às provas de estabilidade e esterilidade, os processos B, C e D revelaram resultados positivos. No entanto, na prova com as ampolas do indicador biológico (esporos de *G. stearothermophilus*) observou-se a letalidade deste microrganismo apenas nos processos C e D.

A nível do teor de proteína, verificou-se que o processo C apresenta diferenças significativas em relação aos processos A e B ($p < 0.05$) e que o processo D, não apresenta diferenças significativas em relação a nenhum dos processos estudados ($p > 0.05$). Uma vez que o processo C, é o que apresenta valores de esterilização mais elevados no alimento (de acordo com os cálculos de F_{0al}), e mesmo assim, é o que apresenta maior teor de proteína, podemos concluir que os processos estudados não afetam o teor de proteína do alimento.

Relativamente à qualidade organolética dos produtos submetidos aos diferentes processos, a prova discriminativa triangular revelou que os provadores não conseguiram encontrar diferenças significativas entre as amostras provenientes dos processos C e D.

Assim, pode-se concluir que a utilização por parte da empresa do processo C ou D vai ser apenas uma questão de economia de tempo e de energia, uma vez que ambos os processos oferecem segurança do produto e não apresentam diferenças sensoriais perceptíveis.

Perspetivas futuras

Uma vez que, segundo Wang *et al.* (2003) e Noronha (1999) os fatores de qualidade dos alimentos apresentam valores de z superiores aos valores de z observados na destruição de microrganismos e seus esporos, e que, quando comparado

um processo de menores temperaturas com outro processo equivalente, usando temperaturas altas com uma curta duração pode-se produzir um alimento de melhor qualidade, garantindo a segurança alimentar, este poderia ser um objetivo de melhoria continua na qualidade das conservas elaboradas na empresa. Faria todo o sentido testar processos com temperaturas superiores a 123°C e fazer um estudo químico mais completo do que o que foi efetuado neste trabalho e, desta forma, tentar encontrar um valor F que proporcione a maior conservação possível das propriedades originais do alimento.

Neste estudo pretendia-se validar o processo existente e se possível reduzir o tempo de esterilização, no entanto a empresa não pretendia aumentar a temperatura para valores superiores a 123°C, a não ser que a segurança do produto o exigisse.

Uma possibilidade também interessante seria tornar os esterilizadores rotativos e permitirem que as latas rodem durante o processo, seria assim, possível diminuir o tempo de esterilização uma vez que a transferência de calor no alimento seria mais rápida, permitindo também diminuir o sobreaquecimento do alimento que está em contato com o corpo da lata, por conseguinte a qualidade dos alimentos superaquecidos pode sofrer alguma degradação (Wang *et al.* 2003; Chalabi *et al.* 1999).

6. BIBLIOGRAFIA

Abdul Ghani, A., G., Farid, M., M., Chen, X., D. e Richards, P. (2001). *Thermal sterilization of canned food in a 3-D pouch using computational fluid dynamics*, Journal of Food Engineering, nº48, pp.147-156.

Banga, J. R., Alonso, A., A., Pérez-Martin, R., I. e Singh, P., R. (1994). *Optimal Control of Heat and Mass Transfer in food and Bioproducts Processing*, Computers Chemistry Engineering, Vol. 18, Suppl., pp. 699-705.

Banga, J. R., Sendín, J. O. H. e Alonso, A. A. (2010). *Efficient and robust multi-objective optimization of food processing: A novel approach with application to thermal sterilization*, Journal of Food Engineering, nº98, pp. 317-324.

Bejarano, S., M. (2001). Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos, Vol.2, pp.1317-1331, Martin & Macias, Cáceres, Espanha.

Bos, C., Gaudichon, C., Tomé, D. (2000) *Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans*. Journal of American College of Nutrition, nº19, pp.191-205.

Chalabi, Z. S., Van Willigenburg, L. G. e Van Straten, G. (1999). *Robust optimal receding horizon control of the thermal sterilization of canned foods*, Journal of Food Engineering, nº40, pp. 207-218.

Emanuele, F. (1946). *Teoría y técnica de la conservación de los alimentos*, Industria de las conservas, 2ªed., pp. 2-27, Ulrico Hoepli-Milano.

Ferrer, C., Tejedor, W., Klein, G., Rodrigo, D., Rodrigo, M. e Martinez, A. (2006). *Monte Carlo Simulation to establish the effect of pH, temperature and heating time on the final load of Bacillus stearothermophilus spores*, Eur Food Res Technol, nº224, pp. 153-157.

Gao, Y., Ju, X., e Jiang, H. (2006). *Analysis of reduction of Geobacillus stearothermophilus spores treated with high hydrostatic pressure and mild heat in milk buffer*, Journal of Biotechnology, nº125, pp. 151-360.

Gil, M., M. (2009). *Kinetics of non-linear microbial inactivation: Modelling, data analysis and experimental design*. Ph.D.thesis, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade católica Portuguesa, Porto, Portugal.

Gutiérrez, A; Carretero, A (2009), *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía*; Fundación Unicaja, Espanha.

Hallman, G., V. e Steven, R. G. (1932). *Sterilizing Canned Foods, Principles Involved in Determining Proper Sterilizing Times and Temperatures*, Vol. 24, nº6, pp. 659-661.

Iciek, J., Blaszczyk, I. e Papiewska, A. (2008). *The effect of organic acid type on thermal inactivation of Geobacillus stearothermophilus spores*, Journal of Food Engineering, nº87, pp.16 – 20.

ISO 4120:1983(E). Sensory analysis – Metodology – Triangular test.

Miller, F. A. (2009). *Obtenção de dados Experimentais para Desenvolvimento de Modelos de Microbiologia “Preditiva” que Descrevam o Comportamento dos Microrganismos durante Processos de Inativação*, Ph.D.thesis, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade católica portuguesa, Porto, Portugal.

Miller, F.A., Gil, M. M., Brandão, T. R. S, Teixeira, P. and Silva, C.L.M. (2009). *Sigmoidal thermal inactivation kinetics of Listeria innocua in broth: influence of strain and growth phase*. Food Control 20: 1151.

Mohamed, I., O. (2003). *Computer simulation of food sterilization using an alternating direction implicit finite difference method*, Journal of food Engineering, nº60, pp.301-306.

Noronha, J. F. (1999). *Notas sobre Processamento Térmico de Alimentos*, Escola Superior Agrária de Coimbra.

Noronha, J. F. (2003). *Apontamentos de Análise sensorial*, Escola Superior Agrária de Coimbra.

NP 1612 (2006). *Carnes e produtos cárneos. Determinação do azoto total e cálculo do teor de proteína bruta*, 2ª ed., Instituto Português da Qualidade.

NP 4404-1 (2002). *Provas de estufa (Método corrente). Apreciação da estabilidade das conservas*, 1ªed., Instituto Português da Qualidade.

NP 2309-2 (1988). *Apreciação da esterilidade das conservas*, 1ªed., Instituto Português da Qualidade.

Oliveira, M. (2012). *Unidade industrial de refeições em lata*, Revista Carne, nº154, pp.46-50.

Pereda, J. A. O., Rodríguez, M^a. I. C., Álvarez, L. F., Sanz, M^a. L. G., Minguillón, G. D. G. F., Perales, L. H. e Cortecero, M^a. D. S. (1998). *Tecnología de los Alimentos. Componentes de los Alimentos y Procesos*, Vol.I, pp. 138-151, SINTESIS, Madrid, Espanha.

Pr NP 4263 (1994). *Análise Sensorial – Vocabulário*, Instituto Português da Qualidade.

Rebollo, M. R. (1998). *Manual de Industrias Carnicas, Publicaciones Tecnicas Alimentarias y Cárnica 2000*, pp.316-324, ANVISA, Madrid, Espanha.

Ricardo, C., P., P. e Teixeira, A., R., N. (1992). *Molécula Biológicas – estrutura e propriedades*, 2ªed., pp.130-133, Didática, Lisboa, Portugal.

Rodríguez-Fernández, M., Balsa-Canto, E., Egea, J., A. E Banga, J., R. (2007). *Identifiability and robust parameter estimation in food process modeling: Application to a drying model*, Journal of Food Engineering, nº83, pp. 374-383.

Segner, W. P., Frazier, W. C. and Calbert, H. E. (1963). *Thermal Inactivation of Heat-Resistant Bacterial Spores in Milk Concentrate at Ultra-High Temperatures*, Journal Dairy Science. nº46, pp. 891-896.

Silliker, J. H., Elliott, R., P., Baird-Parker, A., C., Bryan, F., L., Cristian, J., H., B., Clark, D., S., Olson, J., C. e Roberts, T., A. (1980). *Ecologia microbiana de los alimentos, Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos*, Vol. I, pp 1-38, ACRIBIA, Zaragoza, Espanha.

Silva, D. A., Gramaxo, F., Mesquita, J., Santos, E., M. e Cruz, O. (1988). *Biologia, Vida e Saúde*, 9º Ano, 3ª ed., pp. 44-46, Porto, Portugal.

Simpson, R. e Abakarov, A. (2009). *Optimal scheduling of canned food plants including simultaneous sterilization*, Journal of Food Engineering, nº90, pp. 53-59.

Teixeira, A. A. E Tucker, G. S. (1997). *On-line retort control in termal sterilization of canned foods*, Food Control, Vol.8, nº1, pp.13-20.

Viedma, P., M., Abriouel, H., Omar, N. B., López, R. L., Valdivia, E. e Gálvez, A. (2009). *Inactivation of Geobacillus stearothermophilus in canned food and coconut milk samples by addition of enterocin AS-48*, Food Microbiology, nº26,pp.289-293.

Wang, N. e Brennan, J., G. (1992). *Thermal conductivity of Potato as a function of Moisture Content*, Journal of food Emginnering, nº17, pp. 153-160.

Wang, Y., Wig, T. D., Tang, J. e Hallberg, L. M. (2003). *Sterilization of Foodstuffs Using Radio Frequency Heatig*, Journal of Food Science, vol.68, nº2, pp.539-544.

7. ANEXOS

Tabela 7.1 – Perfil de temperaturas e pressão - Processo A.

Perfil A - 45 minutos a 121°C				
Tempo	Pressão Lata (Bar)	Temperatura lata (°C)	Pressão Autoclave (Bar)	Temperatura Autoclave (°C)
11:48:00	1,175	30,8	0,000	18,9
11:49:00	1,177	31,1	0,010	46,8
11:50:00	1,177	31,3	0,010	70,41
11:51:00	1,178	31,5	0,020	81,83
11:52:00	1,181	31,7	0,030	90,6
11:53:00	1,224	31,9	0,090	97,38
11:54:00	1,231	33,2	0,310	103,5
11:55:00	1,301	35,8	0,550	108,8
11:56:00	1,439	40,8	0,830	114,02
11:57:00	1,796	50,2	1,080	118,72
11:58:00	2,297	62,7	1,090	119,37
11:59:00	2,905	75,5	1,180	120,26
12:00:00	3,543	87,6	1,290	120,86
12:01:00	3,543	98,5	1,530	121,01
12:02:00	3,543	107	1,570	121,25
12:03:00	3,543	112	1,590	121,28
12:04:00	3,543	115,3	1,560	121,36
12:05:00	3,543	117,8	1,550	121,38
12:06:00	3,543	118,7	1,580	121,4
12:07:00	3,543	119,6	1,540	121,5
12:08:00	3,543	120,1	1,550	121,57
12:09:00	3,543	120,5	1,550	121,43
12:10:00	3,543	120,9	1,560	121,25
12:11:00	3,543	121,2	1,520	121,68
12:12:00	3,543	121,4	1,500	121,8
12:13:00	3,543	121,6	1,558	121,45
12:14:00	3,543	121,8	1,513	121,8
12:15:00	3,543	121,8	1,515	121,8
12:16:00	3,543	121	1,516	121,9
12:17:00	3,543	121,1	1,510	121,74
12:18:00	3,543	121,2	1,500	121,79
12:19:00	3,543	121,3	1,515	121,9
12:20:00	3,543	121,3	1,523	121,88
12:21:00	3,543	121,4	1,515	121,79
12:22:00	3,543	121,4	1,500	121,8
12:23:00	3,543	121,4	1,515	121,89
12:24:00	3,543	121,4	1,540	121,32
12:25:00	3,543	121,5	1,550	121,56
12:26:00	3,543	121,5	1,573	121,83
12:27:00	3,543	121,5	1,570	121,63

Tabela 7.1 – Perfil de temperaturas e pressão – Processo A (continuação).

Perfil A - 45 minutos a 121°C (Continuação)				
Tempo	Pressão lata (Bar)	Temperatura lata (°C)	Pressão Autoclave (Bar)	Temperatura Autoclave (°C)
12:28:00	3,543	121,5	1,532	121,56
12:29:00	3,543	121,4	1,535	121,86
12:30:00	3,543	121,1	1,550	121,97
12:31:00	3,543	121	1,524	121,8
12:32:00	3,543	121,2	1,535	121,97
12:33:00	3,543	121,3	1,536	121,88
12:34:00	3,543	121,4	1,525	121,85
12:35:00	3,543	121,5	1,540	121,96
12:36:00	3,543	121,5	1,530	121,96
12:37:00	3,543	121,5	1,530	121,86
12:38:00	3,543	121,6	1,540	121,94
12:39:00	3,543	121,6	1,520	121,84
12:40:00	3,543	121,6	1,540	121,8
12:41:00	3,543	121,6	1,530	121,95
12:42:00	3,543	121,6	1,530	121,85
12:43:00	3,543	121,6	1,540	121,9
12:44:00	3,543	121,6	1,540	121,96
12:45:00	3,543	121,6	1,530	121,86
12:46:00	3,543	121,6	1,710	120,49
12:47:00	3,543	121,6	1,630	118,83
12:48:00	3,543	121,6	1,690	118,08
12:49:00	3,543	121,6	1,670	117,73
12:50:00	3,543	121,6	1,610	113,99
12:51:00	3,543	118,4	1,550	78,92
12:52:00	2,721	108,9	1,550	64,62
12:53:00	2,607	78,8	1,520	55,68
12:54:00	2,869	58,3	1,510	51,9
12:55:00	2,527	46,7	1,520	49,3
12:56:00	2,439	42,2	1,510	47,2
12:57:00	2,346	38,7	1,530	45,13
12:58:00	2,337	36,6	1,560	43,13
12:59:00	2,278	35,3	1,530	41,15
13:00:00	2,279	34,4	1,610	39,58
13:01:00	2,415	33,5	1,590	38,4
13:02:00	2,276	32,6	1,660	37,5
13:03:00	2,343	31,7	1,650	36,72
13:04:00	2,322	31	1,600	35,92
13:05:00	2,366	30,6	1,660	35,35
13:06:00	2,339	30,2	1,590	34,79
13:07:00	2,392	30,1	0,000	34,7

Tabela 7.2 – Perfil de temperaturas e pressão – Processo B.

Perfil B - 30 minutos a 123°C				
Tempo	Pressão lata (Bar)	Temperatura lata (°C)	Pressão Autoclave (Bar)	Temperatura Autoclave (°C)
12:03:46	1,339	24,9	0,000	63,9
12:04:46	1,804	47,6	0,030	90
12:05:46	3,132	76,7	0,410	113
12:06:46	3,642	100,8	1,180	123,0
12:07:46	3,889	111,7	1,570	123,1
12:08:46	3,998	116,7	1,590	122,9
12:09:46	3,998	119,2	1,560	123,0
12:10:46	3,998	120,5	1,550	121,8
12:11:46	3,998	121,2	1,580	122,8
12:12:46	3,998	121,6	1,540	123,1
12:13:46	3,998	121,8	1,550	123,0
12:14:46	3,998	123,0	1,550	123,0
12:15:46	3,998	123,1	1,560	123,3
12:16:46	3,998	122,9	1,520	122,9
12:17:46	3,998	123,0	1,500	123,1
12:18:46	3,998	123,1	1,558	123,0
12:19:46	3,998	123,2	1,513	122,9
12:20:46	3,998	123,0	1,515	123,09
12:21:46	3,998	122,9	1,516	123,1
12:22:46	3,998	123,1	1,510	122,9
12:23:46	3,998	122,9	1,500	123,0
12:24:46	3,998	123,2	1,515	122,9
12:25:46	3,998	123,1	1,523	123,09
12:26:46	3,998	123,0	1,515	122,9
12:27:46	3,998	123,1	1,500	123,0
12:28:46	3,998	123,2	1,515	123,0
12:29:46	3,998	122,9	1,540	122,8
12:30:46	3,998	123,1	1,550	123,09
12:31:46	3,998	123,0	1,573	122,9
12:32:46	3,998	123,0	1,570	122,9
12:33:46	3,998	123,0	1,532	123,0
12:34:46	3,998	123,0	1,535	123,0
12:35:46	3,998	123,1	1,550	123,0
12:36:46	3,81	123,0	1,524	119,4
12:37:46	2,704	123,0	1,535	118,3
12:38:46	2,413	119,2	1,536	117,3
12:39:46	2,221	115,8	1,525	114,4
12:40:46	2,068	113,2	1,540	110,7
12:41:46	1,967	111,6	1,530	98,9
12:42:46	1,914	110,5	1,530	88,9
12:43:46	1,868	95,3	1,540	77,4
12:44:46	1,877	77,5	1,520	67,69

Tabela 7.2 – Perfil de temperaturas e pressão – Processo B (continuação).

Perfil B - 30 minutos a 123°C (Continuação)				
Tempo	Pressão lata (Bar)	Temperatura lata (°C)	Pressão Autoclave (Bar)	Temperatura Autoclave (°C)
12:45:46	1,84	69,8	1,540	61,5
12:46:46	1,932	58,4	1,530	53,79
12:47:46	1,829	55,6	1,530	51,09
12:48:46	1,819	51,3	1,540	48,59
12:49:46	1,848	49,4	1,540	46,099
12:50:46	1,797	45,6	1,530	44,4
12:51:46	1,855	44,6	1,710	42,2
12:52:46	1,844	42,5	1,630	39,79
12:53:46	1,857	41,6	1,690	37,79
12:54:46	1,823	40,5	1,670	36,2
12:55:46	1,784	40,1	1,590	34,9
12:56:46	1,325	37,3	0,000	33

Tabela 7.3 – Perfil de temperaturas e pressão – Processo C.

Perfil C - 40 minutos a 123°C				
Tempo	Pressão lata (Bar)	Temperatura lata (°C)	Pressão Autoclave (Bar)	Temperatura Autoclave (°C)
10:53:24	1,05	27,3	0,23	31,4
10:54:24	1,06	27,4	0,25	77,2
10:55:24	1,06	27,4	0,71	102,0
10:56:24	1,06	27,4	1,58	123,0
10:57:24	1,07	27,4	1,58	123,0
10:58:24	1,38	28,2	1,56	122,9
10:59:24	1,84	42,8	1,59	122,9
11:00:24	3,05	69,8	1,58	122,9
11:01:24	3,64	96,6	1,48	123,2
11:02:24	3,88	110,7	1,49	123,2
11:03:24	3,99	116,8	1,58	122,8
11:04:24	3,99	119,6	1,58	122,9
11:05:24	3,99	120,9	1,47	123,0
11:06:24	3,99	121,7	1,52	123,4
11:07:24	3,99	123	1,56	122,9
11:08:24	3,99	123,2	1,50	123,2
11:09:24	3,99	123,3	1,58	122,9
11:10:24	3,99	123	1,59	123,1
11:11:24	3,99	123	1,52	123,0
11:12:24	3,99	123	1,52	123,2
11:13:24	3,99	122,9	1,53	123,0
11:14:24	3,99	122,9	1,50	122,7
11:15:24	3,99	123	1,48	122,8
11:16:24	3,99	123	1,48	123,0
11:17:24	3,99	123	1,49	123,2
11:18:24	4,03	123	1,57	122,9

Tabela 7.3 – Perfil de temperaturas e pressão – Processo C (continuação).

Perfil C - 40 minutos a 123°C (Continuação)				
Tempo	Pressão lata (Bar)	Temperatura lata (°C)	Pressão Autoclave (Bar)	Temperatura Autoclave (°C)
11:19:24	4,03	123,1	1,48	123,2
11:20:24	4,04	123,0	1,57	122,9
11:21:24	4,04	123,0	1,54	122,8
11:22:24	4,04	123,0	1,52	122,9
11:23:24	4,04	123,0	1,51	123,1
11:24:24	4,04	123,0	1,52	122,9
11:25:24	4,03	123,0	1,50	122,8
11:26:24	4,04	123,0	1,49	123,0
11:27:24	4,04	123,0	1,50	123,1
11:28:24	4,02	123,0	1,57	122,3
11:29:24	4,02	123,0	1,49	123,1
11:30:24	4,03	123,0	1,51	122,9
11:31:24	4,04	123,0	1,53	122,8
11:32:24	4,03	123,0	1,52	123,4
11:33:24	4,04	123,0	1,48	122,9
11:34:24	4,02	123,0	1,54	123,4
11:35:24	4,01	123,0	1,47	123,0
11:36:24	4,01	123,0	1,62	120,6
11:37:24	4,02	123,0	1,63	120,2
11:38:24	4,02	123,0	1,66	119,2
11:39:24	4,02	123,0	1,66	117,9
11:40:24	4,02	123,0	1,66	110,8
11:41:24	3,76	123,0	1,66	103,4
11:42:24	2,71	107,3	1,65	95,8
11:43:24	2,30	80,3	1,60	73,5
11:44:24	2,08	62,4	1,61	59,8
11:45:24	1,99	51,3	1,56	48,7
11:46:24	1,91	49,1	1,59	38,2
11:47:24	1,82	41,3	1,54	36,7
11:48:24	1,83	40,5	1,59	36,6
11:49:24	1,80	38,4	1,50	36,2
11:50:24	1,77	37,2	0,00	35,6

Tabela 7.4 – Perfil de temperaturas e pressão – Processo D.

Perfil D - 45 minutos a 123°C				
Tempo	Pressão lata (Bar)	Temperatura lata (°C)	Pressão Autoclave (Bar)	Temperatura Autoclave (°C)
11:48:00	1,175	30,8	0,000	18,9
11:49:00	1,177	31,1	0,010	46,8
11:50:00	1,177	31,3	0,010	70,41
11:51:00	1,178	31,5	0,020	81,83
11:52:00	1,181	31,7	0,030	90,6
11:53:00	1,224	31,9	0,090	97,38
11:54:00	1,231	33,2	0,310	103,5
11:55:00	1,301	35,8	0,550	108,8
11:56:00	1,439	40,8	0,830	114,02
11:57:00	1,796	50,2	1,080	118,72
11:58:00	2,297	62,7	1,090	119,37
11:59:00	2,905	75,5	1,180	120,26
12:00:00	3,543	87,6	1,290	121,86
12:01:00	3,543	98,5	1,530	123
12:02:00	3,543	107	1,570	123,1
12:03:00	3,543	112	1,590	122,9
12:04:00	3,543	115,3	1,560	122,9
12:05:00	3,543	117,8	1,550	123
12:06:00	3,543	118,7	1,580	123
12:07:00	3,543	119,6	1,540	122,9
12:08:00	3,543	120,1	1,550	123
12:09:00	3,543	120,5	1,550	123
12:10:00	3,543	120,9	1,560	123
12:11:00	3,543	123,0	1,520	122,9
12:12:00	3,543	123,0	1,500	122,8
12:13:00	3,543	123,0	1,558	122,9
12:14:00	3,543	123,0	1,513	123
12:15:00	3,543	123,0	1,515	122,8
12:16:00	3,543	123,0	1,516	122,9
12:17:00	3,543	123,0	1,510	123
12:18:00	3,543	123,0	1,500	123,2
12:19:00	3,543	123,1	1,515	123,1
12:20:00	3,543	123,0	1,523	123,3
12:21:00	3,543	123,0	1,515	123,0
12:22:00	3,543	123,0	1,500	123,0
12:23:00	3,543	123,0	1,515	122,9
12:24:00	3,543	123,0	1,540	123
12:25:00	3,543	123,0	1,550	122,8
12:26:00	3,543	123,0	1,573	122,8
12:27:00	3,543	123,0	1,570	123,0
12:28:00	3,543	123,0	1,532	123,1
12:29:00	3,543	123,0	1,535	122,8

Tabela 7.4 – Perfil de temperaturas e pressão – Processo D (continuação).

Perfil D - 45 minutos a 123°C (Continuação)				
Tempo	Pressão lata (Bar)	Temperatura lata (°C)	Pressão Autoclave (Bar)	Temperatura Autoclave (°C)
12:30:00	3,543	123,0	1,550	123,0
12:31:00	3,543	123,0	1,524	123,0
12:32:00	3,543	123,0	1,535	123,2
12:33:00	3,543	123,0	1,536	123,1
12:34:00	3,543	123,0	1,525	123,1
12:35:00	3,543	123,0	1,540	122,9
12:36:00	3,543	123,0	1,530	122,9
12:37:00	3,543	123,0	1,530	123,0
12:38:00	3,543	123,0	1,540	123,0
12:39:00	3,543	123,0	1,520	123,0
12:40:00	3,543	123,0	1,540	123,4
12:41:00	3,543	123,0	1,530	123,2
12:42:00	3,543	123,0	1,530	123,2
12:43:00	3,543	123,0	1,540	123,3
12:44:00	3,543	123,0	1,540	123,0
12:45:00	3,543	123,0	1,530	123,0
12:46:00	3,543	123,0	1,710	120,9
12:47:00	3,543	123,0	1,630	118,8
12:48:00	3,543	123,0	1,690	118,8
12:49:00	3,543	123,0	1,670	117,7
12:50:00	3,543	123,0	1,610	113,9
12:51:00	3,543	121,4	1,550	78,9
12:52:00	2,721	108,9	1,550	64,6
12:53:00	2,607	78,8	1,520	55,6
12:54:00	2,869	58,3	1,510	51,9
12:55:00	2,527	56,7	1,520	43,2
12:56:00	2,439	52,2	1,510	40,1
12:57:00	2,346	48,7	1,530	39,2
12:58:00	2,337	46,6	1,560	39,6
12:59:00	2,278	45,3	1,530	41,5
13:00:00	2,279	44,4	1,610	39,5
13:01:00	2,415	43,5	1,590	38,4
13:02:00	2,276	42,6	1,660	37,5
13:03:00	2,343	41,7	1,650	36,7
13:04:00	2,322	41,0	1,600	35,2
13:05:00	2,366	40,6	1,660	35,1
13:06:00	2,339	40,2	1,590	34,7
13:07:00	2,392	39,1	0,000	34,4

Folha de Prova – Teste triangular

Nome: _____ Data: _____

Produto: **Dobrada com feijão D' Avó**

Tem à sua frente três amostras de Dobrada com feijão D'Avó. **Duas delas são de esterilizações iguais e uma é de esterilização diferente das outras duas.**

Prove e seleccione a **amostra diferente**

Indique o código da amostra: _____

Comentários:

OBRIGADO

Tabela 7.5 - Número crítico de respostas corretas para os testes triangulares. Fonte: Noronha, 2003.

n	Triangular a significância 5% (Respostas corretas)	Triangular a significância 1% (Respostas corretas)
5	4	5
6	5	6
7	5	6
8	6	7
9	6	7
10	7	8