



**Mariana Batista da Mota
Caetano**

**Segurança e qualidade alimentar na
produção industrial de bolos e croissants
de massa folhada recheados**

**Food safety and quality in industrial
production of puff pastry and filled cakes
and croissants**



**Mariana Batista da Mota
Caetano**

**Segurança e qualidade alimentar na
produção industrial de bolos e croissants
de massa folhada recheados**

**Food safety and quality in industrial
production of puff pastry and filled cakes
and croissants**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica com especialização em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e orientação empresarial dos Engenheiros Carlos Mucho e Sandra Feija.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmã e avós pelo apoio e amor incondicional prestado.

o júri

presidente

Prof.^a Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
professora auxiliar com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes
Professor auxiliar com agregação do Departamento de Química da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

orientador

Prof. Doutor Manuel António Coimbra
professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Engenheiro Carlos Muacho e à Engenheira Sandra Feija pela oportunidade de estágio, por todos conhecimentos transmitidos e por toda a orientação e ajuda prestada no meio empresarial.

Em segundo lugar queria agradecer ao meu orientador Professor Doutor Manuel António Coimbra pela disponibilidade e conhecimento que me transmitiu enquanto professor e orientador.

Um obrigado também a todos os colaboradores da empresa que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento, por toda a disponibilidade e amabilidade sempre prestadas e pelos momentos agradáveis que me proporcionaram, em particular à Ana Rita Domingos, Sílvia Mendes e Cláudia Fazendeiro.

Por fim, um especial agradecimento à minha família e amigos, sobretudo aos meus pais, irmã e avós, que sempre me apoiaram e me proporcionaram as condições necessárias para eu chegar até aqui. Foram eles os principais responsáveis pelo meu sucesso académico.

A todos o meu enorme obrigada!

palavras-chave

produtos de panificação, bolos, croissants, segurança e qualidade alimentar, contaminações, microrganismos, bolores

resumo

Os produtos de panificação/confeitaria em que este trabalho se centra são caracterizados por serem produzidos com massa folhada e recheados com um creme de cacau ou baunilha. São produzidos croissants de diferentes tamanhos (pequenos, médios e grandes) e um bolo cilíndrico também de massa folhada. Nestes produtos a maior preocupação é a sua contaminação com perigos biológicos, mais propriamente com bolores. Tendo em conta o crescimento e desenvolvimento da indústria alimentar, que obriga à constante revisão da implementação de sistemas e medidas que garantam a segurança e qualidade dos alimentos que chegam ao consumidor, o trabalho desenvolvido passou por estudar quais os principais fatores que poderão estar na base do aparecimento de bolores, com vista à otimização das medidas de manutenção da segurança do produto final e garantia da sua qualidade. Foram avaliados dados de anos anteriores referentes a diversos parâmetros analíticos, microbiológicos e de produção dos bolos e croissants. A análise de dados relativos ao pH e à humidade relativa do produto acabado, bem como relativos às máquinas de embalar e à higienização da linha de produção, não foi suficiente para chegar à conclusão de que estes parâmetros poderiam estar a ter efeito no aparecimento de bolores nos bolos. Em contrapartida, a atividade da água do produto acabado e a carga microbiológica apresentada pelos cremes utilizados como recheio foram os dois parâmetros que mais evidências apresentaram quanto à sua possível contribuição para o desenvolvimento de microrganismos. Alguns dos trabalhos planeados, que tinham como principal objetivo justificar as hipóteses colocadas e confirmar os possíveis pontos de contaminação do produto, não foram possíveis de realizar devido à interrupção do estágio como consequência de pandemia de Covid-19. No entanto, são feitas propostas de estudos futuros a serem realizados na empresa.

keywords

Bakery products, cakes, croissants, food safety and quality, contamination, microorganisms, moulds

abstract

This work is focused on bakery products produced with puff pastry and filled with a cocoa or vanilla cream. Croissants of different sizes (small, medium, and big) and a cylindrical cake also made of puff pastry were produced. The main concern about the production of these products is the contamination with biological hazards, namely, molds. Considering the growth and development of the food industry, which requires a constant review of the implementation of systems and measures to ensure food safety and quality, the work developed studied the main factors that may be at the basis of the appearance of contaminations with molds. This allowed to optimize the measures for maintaining the safety of the end-product and quality assurance. Data from previous years regarding various analytical, microbiological and production parameters of the cakes and croissants were evaluated. The analysis of data on the pH and relative humidity of the finished product, as well as on the packaging machines and the hygiene of the production line, was not sufficient to reach the conclusion that these parameters could influence the appearance of molds. In contrast, the water activity of the finished product and the microbiological load presented by the creams used as filling, were the two parameters that showed the most evidence regarding their possible contribution to the development of microorganisms in the cakes. Some of the planned works, whose main objective was to justify the hypothesis and confirm the possible points of contamination of the product, were not possible to carry out due to the interruption of the internship because of the Covid-19 pandemic. However, proposals were made for future studies to be carried on by the company.

Índice

Índice de Figuras	I
Índice de Tabelas	III
1. Bolos e croissants de massa folhada recheados	1
1.1. Processo de produção	1
1.1.1. Cremes	1
1.1.2. Massa folhada	2
1.1.3. Bolos e Croissants.....	4
1.2. Características do produto final.....	5
1.2.1. Características intrínsecas	5
1.2.2. Tabela nutricional	5
2. Segurança e Qualidade Alimentar	6
2.1. Plano HACCP.....	6
2.2. Perigos alimentares	8
2.3. Deterioração microbiológica em produtos de panificação	10
2.3.1. Fatores que afetam o crescimento de microrganismos.....	11
2.3.1.1. Fatores intrínsecos	12
2.3.1.2. Fatores extrínsecos	14
2.3.2. Microrganismos causadores de deterioração em produtos de panificação ...	15
2.3.2.1. Bactérias	15
2.3.2.2. Leveduras	17
2.3.2.3. Bolores.....	18
2.3.3. Medidas preventivas para reduzir a probabilidade de contaminação com microrganismos e o seu crescimento.....	20
2.3.3.1. Reformulação do produto	20
2.3.3.2. Uso de conservantes	21
2.3.3.3. Embalamento em atmosfera modificada	23
2.3.3.4. Controlo das águas.....	24
2.3.3.5. Higienização	26
3. Enquadramento do trabalho de estágio em ambiente empresarial	29
4. Análises de controlo de qualidade	30
4.1. Controlo Analítico.....	30

4.1.1. Controlo do pH	31
4.1.2. Controlo da atividade da água.....	31
4.1.3. Controlo da % de gordura e % de humidade	31
4.1.4. Controlo da viscosidade dos cremes	32
4.1.5. Controlo da acidez das madres (fermento natural)	32
4.1.6. Controlo da cor	32
4.2. Controlo Microbiológico.....	33
4.2.1. Amostragem.....	33
4.2.2. Diluições	34
4.2.3. Análise de produto acabado, cremes, matérias-primas e testes de superfície	35
4.2.4. Análise de águas	35
4.3. Acompanhamento de Auditoria interna	37
4.4. Acompanhamento da linha de produção	37
4.5. Análise do plano HACCP da linha de produção	38
5. Análise comparativa de dados de anos anteriores para estudo de contaminações microbiológicas	39
5.1. Máquinas de embalar.....	42
5.2. Higienização da linha	44
5.3. pH.....	45
5.4. Humidade relativa	47
5.5. Atividade da água do produto acabado	49
5.6. Carga microbiológica dos cremes	51
6. Trabalho que ficou por realizar e estudos futuros.....	58
6.1. Análises microbiológicas	58
6.2. Estudo da atividade da água do produto intermédio, produto acabado e cremes	63
6.3. Sugestões de estudos futuros	64
6.3.1. Temperatura de embalamento.....	64
6.3.2. Máquinas de embalar	65
7. Conclusões	67
8. Referências Bibliográficas.....	68

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação de cada produto: a) bolo cilíndrico; b) croissant grande; c) croissants pequenos.	1
Figura 2 – Fase 1 do processo de laminagem da massa: extrusão da massa e da margarina e disposição de uma camada de margarina entre duas camadas de massa.	3
Figura 3 – Fase 2 do processo de laminagem da massa: dobras sucessivas da massa e da margarina para produção de massa folhada.	3
Figura 4 – Processo de fermentação: aspeto inicial (esquerda) e aspeto final (direita) do produto após 4 horas a 30-40 °C e a 80-95% de humidade.	3
Figura 5 – Injeção mecânica de creme nos bolos.	4
Figura 6 – Representação de um medidor de pH de bancada Sartorius Docu-pH+ Meter	31
Figura 7 – Representação de um medidor da a_w AquaLab Pre – Water Activity Analyzer	31
Figura 8 – Representação do aparelho InfraAlyser Zeutec SpectraAlyzer	31
Figura 9 – Representação do viscosímetro mecânico Brookfield Viscometer Model RVT	32
Figura 10 – Representação do aparelho de medição de cor Minolta Baking Metter BC-10	32
Figura 11 - Diagrama referente às diluições a realizar e sua distribuição pelas diferentes placas de incubação	34
Figura 12 – Representação de dois exemplos de contaminação com bolores na zona de injeção dos bolos cilíndricos.....	40
Figura 13 - Percentagem de produções com ocorrência de contaminação com bolores vs total de produções de 2018 e 2019 para cada produto produzido	40
Figura 14 - Percentagem de produções com ocorrência de reclamações vs total de produções de 2018 e 2019 para cada produto produzido	40
Figura 15 - Número de recolhas por máquina de embalar correspondentes a amostras que apresentaram contaminação visível com bolores ao longo dos anos 2018 e 2019.....	43
Figura 16 – Número médio de recolhas anual por máquina de embalar de todas as amostras recolhidas nos anos 2018 e 2019 utilizadas no estudo de vida útil	43

Figura 17 - Percentagens de produções em que se verificaram contaminações vs número de semanas correspondentes aos dias em que cada zona da linha de produção (laminagem, injeção e embalagem) se manteve sem limpeza	45
Figura 18 - Médias dos valores de pH de cada produção de bolo cilíndrico, com distinção das produções com e sem contaminação.	46
Figura 19 - Médias dos valores de humidade relativa de cada produção de bolo cilíndrico, com distinção das produções com e sem contaminação.....	48
Figura 20 – Médias dos valores de a_w correspondentes às produções globais, produções sem contaminação, produções com contaminação e produções com reclamações dos bolos cilíndricos.....	50
Figura 21 - Médias dos valores de a_w de cada produção de bolo cilíndrico, com distinção das produções com e sem contaminação	51
Figura 22 – Percentagens totais de cremes, recolhidos dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção, que apresentaram carga microbiológica nas análises de Contagem Total e de Bolores nos anos de 2018 e 2019	53
Figura 23 – Percentagens totais de cremes, recolhidos dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção, que apresentaram carga microbiológica na gama ótima (verde) e na gama aceitável (amarelo), referentes às análises de Contagem Total e de Bolores nos anos de 2018 e 2019	53
Figura 24 – Contagem Total (mesófilos) referente às amostras dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção dos cremes de chocolate utilizados na produção dos bolos cilíndricos	55
Figura 25 – Contagem Total (mesófilos) referentes às amostras dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção dos cremes de chocolate utilizados na produção dos bolos cilíndricos	56
Figura 26 – Localização dos pontos de amostragem ao longo de toda a linha de produção	62

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Características intrínsecas do bolo cilíndrico e croissants.	5
Tabela 2 - Tabela nutricional referente ao bolo cilíndrico e croissants	5
Tabela 3 - Parâmetros analíticos avaliados em cada fase do produto (produto intermédio e produto acabado), cremes e madres.	30
Tabela 4 – Incubação de placas - meio de cultura, temperatura de incubação e tempo de incubação para cada agente a analisar	35
Tabela 5 – Valores de pH referentes a 2018 e 2019 para o bolo cilíndrico e croissants e respetiva gama ótima	46
Tabela 6 - Humidade relativa referentes a 2018 e 2019 para o bolo cilíndrico e croissants e respetiva gama ótima	48
Tabela 7 – Valores de atividade da água referentes a 2018 e 2019 para o bolo cilíndrico e croissants e respetiva gama ótima.....	49
Tabela 8 – Contagem Total (mesófilos) referente às amostras dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção dos cremes de chocolate utilizados em todas as produções e na produção dos bolos cilíndricos	54
Tabela 9 –Contagem Total (mesófilos) referentes às amostras dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção dos cremes de chocolate utilizados em todas as produções e na produção dos bolos cilíndricos	56
Tabela 10 – Planificação das análises microbiológicas a realizar ao longo da linha de produção dos bolos e croissants	60

1. Bolos e croissants de massa folhada recheados

Os bolos e croissants de massa folhada recheados são caracterizados por serem produzidos com massa folhada e terem no seu interior um creme de cacau ou baunilha. Na empresa, são produzidos croissants de diferentes tamanhos (pequeno, médio e grande) e um bolo cilíndrico também de massa folhada (Figura 1). Qualquer um dos croissants pode ser recheado com creme de cacau ou baunilha, enquanto o bolo e o croissant médio têm apenas recheio de cacau.

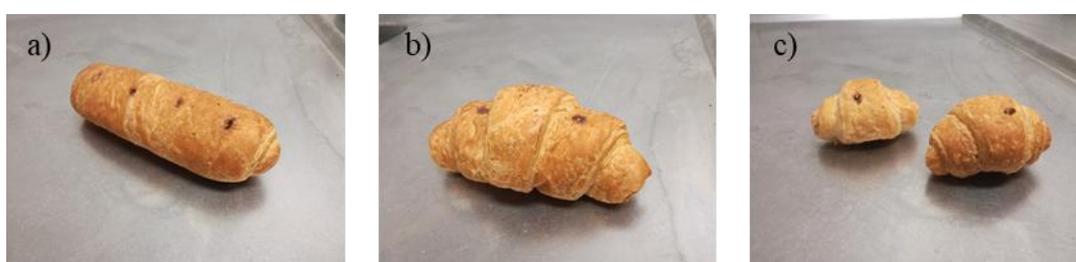


Figura 1 – Representação de cada produto: a) bolo cilíndrico; b) croissant grande; c) croissants pequenos.

1.1. Processo de produção

1.1.1. Cremes

Os cremes utilizados como recheio são produzidos num pasteurizador automatizado, que realiza os processos de aquecimento, arrefecimento e agitação de forma automática, sendo apenas necessário proceder à adição dos ingredientes e à ativação e/ou desativação digital dos diferentes ciclos. Os ingredientes maioritários são o açúcar, a água, a margarina e o leite em pó. No caso do creme de chocolate, é também adicionado cacau e no caso do creme de baunilha são adicionados manteiga, soro de leite e gema de ovo. São utilizados também conservantes, emulsionantes e um aromatizante de baunilha. No final da produção os cremes são transferidos para um tanque de inox, onde ficam armazenados até serem utilizados. Estes são armazenados primeiramente numa câmara entre 10 e 14 °C com o objetivo de garantir a passagem da fase líquida para uma fase mais sólida/consistente (esta fase é designada por “cristalização”). Por último são levados para uma câmara com uma temperatura relativamente mais elevada (25 – 30

°C) onde têm de estar armazenados no mínimo três dias até serem utilizados, de forma a ocorrer a sua estabilização.

1.1.2. Massa folhada

A produção dos croissants e bolos recheados começa com a **produção da massa folhada**, que é dividida em três fases, com agitação a velocidades e tempos definidos. Os ingredientes maioritários para a sua produção são a farinha de trigo, a água, o açúcar, a margarina, a gema de ovo, a madre e o emulsionante *Dimodan*. A madre é um fermento natural, que é continuamente mantido e regenerado na empresa e que tem como principais funções dar sabor e volume, melhorar a textura e conferir maior validade ao produto final. É ainda utilizado um conservante. A água utilizada na produção da massa tem de estar a 1 °C ou ser substituída por gelo, de forma a que no final da sua produção a massa apresente uma temperatura máxima de 24 °C. Esta temperatura é necessária para garantir a correta e rápida hidratação dos ingredientes e para que a margarina posteriormente utilizada na etapa seguinte mantenha a sua consistência.

A segunda etapa da produção da massa folhada centra-se num processo denominado de **laminagem**. Este processo vai garantir à massa as suas características de massa folhada. A massa é transferida para uma extrusora que vai produzir duas camadas de massa. Entre essas duas camadas é colocada uma camada de margarina (Figura 2) e posteriormente a massa com a margarina é dobrada múltiplas vezes, obtendo-se diversas camadas de massa e margarina alternadas (Figura 3), que vão deste modo garantir as características de massa folhada. Neste processo, a margarina tem a função de dar sabor ao produto e de separar as várias camadas de massa, de modo a conferir ao croissant uma elevação/crescimento adequado. Após a massa ser laminada, esta é cortada e enrolada no formato pretendido de croissant ou bolo cilíndrico.



Figura 2 – Fase 1 do processo de laminagem da massa: extrusão da massa e da margarina e disposição de uma camada de margarina entre duas camadas de massa.



Figura 3 – Fase 2 do processo de laminagem da massa: dobras sucessivas da massa e da margarina para produção de massa folhada.

A etapa que se segue à laminagem é a **fermentação**, onde o produto é colocado numa estufa de fermentação que se encontra a uma temperatura entre os 30 e 40 °C e a uma humidade entre 80 e 95%, durante cerca de quatro horas. O principal objetivo desta etapa é a elevação da massa, de modo a que o produto atinja o tamanho e a textura/consistência desejados (Figura 4). As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que constituem o fermento adicionado à massa, utilizam como substratos a maltose e a glucose resultantes da hidrólise do amido da farinha por amilases endógenas. Como resultado da fermentação alcoólica são produzidos CO₂, etanol e metabolitos secundários. O CO₂ causa a expansão e a levedação da massa, aumentando o volume do croissant¹.



Figura 4 – Processo de fermentação: aspeto inicial (esquerda) e aspeto final (direita) do produto após 4 horas a 30-40 °C e a 80-95% de humidade.

Após 4h de fermentação, os produtos levedados são retirados da estufa de fermentação e levados imediatamente para o forno, para se proceder à sua **cozedura**. Consoante o tipo de produto, estes são cozidos entre 170 e 205 °C, durante aproximadamente 15 minutos. Durante a cozedura, a água existente na massa é convertida em vapor, o que provoca o aumento da pressão entre cada camada de massa, levando à

sua elevação, produzindo-se assim a textura escamosa característica da massa folhada². Depois da cozedura, o produto é colocado a arrefecer durante aproximadamente uma hora, até atingir 30 °C, que é a temperatura máxima adequada para o seu embalamento de forma a evitar a ocorrência de condensações.

1.1.3. Bolos e Croissants

Para a produção dos produtos recheados com creme, é necessário incluir um passo de **injeção**. O mecanismo de injeção passa pelo enchimento contínuo de agulhas com o creme pretendido, que vão perfurar o bolo/croissant na parte superior (figura 5), injetando a quantidade programada de recheio.



Figura 5 – Injeção mecânica de creme nos bolos.

O último passo é o **embalamento e armazenamento** dos bolos e croissants. Os bolos cilíndricos e os croissants médios e grandes são embalados em bolsas individuais, enquanto os croissants pequenos são embalados em bolsas de várias unidades. As bolsas são posteriormente armazenadas em caixas e seguem para armazém.

1.2. Características do produto final

1.2.1. Características intrínsecas

Alguns dos produtos, para além do tamanho e formato diferentes, diferem ainda nas suas características intrínsecas, como a atividade da água (a_w), o pH, a percentagem de gordura e a percentagem de humidade (Tabela 1). Isto deve-se ao facto de apresentarem algumas diferenças na formulação da massa, bem como, em alguns casos, também haver influência do tipo de recheio (chocolate ou baunilha).

Tabela 1 - Características intrínsecas do bolo cilíndrico e croissants.

Produto	a_w	pH	% gordura	% humidade
Bolo cilíndrico (chocolate)	0,760 – 0,860	5,50 – 5,70	17,0 – 21,5	19,6 – 21,6
Croissant grande de chocolate	0,770 – 0,880	5,50 – 5,70	16,0 – 19,0	18,5 – 21,0
Croissant grande de baunilha	0,770 – 0,880	5,50 – 5,70	16,0 – 19,0	18,5 – 21,0
Croissant médio (chocolate)	0,81 – 0,85	5,50 – 5,70	16,0 – 20,0	19,0 – 22,0
Croissant pequeno de chocolate	0,75 – 0,855	5,50 – 5,70	16,0 – 20,0	17,0 – 19,0
Croissant pequeno baunilha	0,75 – 0,855	5,60 – 5,80	16,0 – 20,0	17,0 – 19,0

1.2.2. Tabela nutricional

Na Tabela 2 são apresentadas as características nutricionais do bolo cilíndrico e croissants, de acordo com os seus rótulos. É possível verificar que cada um apresenta características distintas, que variam conforme a formulação da massa e do recheio.

Tabela 2 - Tabela nutricional referente ao bolo cilíndrico e croissants

Parâmetro	Bolo cilíndrico	Croissant médio	Croissant grande chocolate	Croissant grande baunilha	Croissant pequeno chocolate	Croissant pequeno baunilha
Energia (kj/kcal)	1672/400	1723/412	1580/377	1579/377	1723/412	1579/377
Lípidos (g)	19,6	20,1	16,2	16,9	20,1	16,9
Dos quais saturados (g)	10,3	9,9	9,5	10,2	9,9	10,2
Hidratos de carbono (g)	46,8	48,6	49,0	46,9	48,6	46,9
Dos quais açúcares (g)	17,8	18,1	18,9	24,1	18,1	24,1
Fibra (g)	2,9	2,6	2,3	3,8	2,6	3,8
Proteínas (g)	7,6	7,8	7,6	7,1	7,8	7,1
Sal (g)	0,72	0,66	0,50	0,50	0,66	0,50

2. Segurança e Qualidade Alimentar

A segurança e qualidade alimentar são consideradas questões fundamentais quer para a indústria alimentar, quer para o consumidor. A importância desta temática aumentou devido à ocorrência de casos mediáticos de contaminação alimentar, como o caso da BSE (doença das vacas loucas), da presença de dioxinas na alimentação para animais e da presença do herbicida aminotriazole em arandos. Após estas crises alimentares tornou-se obrigatória a implementação de medidas de Segurança e Qualidade em toda a indústria alimentar^{3,4}. Essas medidas incluem todas as etapas de produção de alimentos, como fornecimento de matérias-primas, produção, embalagem, armazenamento, transporte, desenvolvimento, manutenção de equipamentos de produção e formação de funcionários³. De acordo com a FAO, o conceito “Segurança Alimentar” refere-se a aspetos relacionados com “todos os riscos, crónicos ou agudos que podem tornar os alimentos prejudiciais à saúde do consumidor”⁵, ou seja, assegurando que os alimentos preparados e/ou consumidos de acordo com a forma pretendida não irão causar danos no consumidor⁶. O conceito “Qualidade Alimentar” inclui todos os “atributos que influenciam o valor de um produto para o consumidor. Isso inclui atributos negativos como a deterioração, a contaminação, descoloração e odores desagradáveis, e atributos positivos como a sua origem, a cor, sabor, textura e o método de processamento dos alimentos”⁵.

2.1. Plano HACCP

Como forma de resolver os problemas associados à segurança alimentar, evitando a ocorrência de contaminações alimentares e posteriores consequências adversas para a saúde, são utilizados e implementados sistemas de Segurança e Qualidade Alimentar. O sistema considerado como o mais eficaz para manter a garantia do fornecimento seguro de alimentos é o Sistema HACCP (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)⁷. Este sistema tem como base uma metodologia preventiva, que identifica, avalia e controla os perigos e riscos que são significativos e possíveis de ocorrer nos diferentes géneros alimentícios ao longo de toda a cadeia alimentar, desde a produção primária ao manuseamento e consumo final^{6,8}, garantindo que só são colocados no mercado quando são seguros. Em 1993 o HACCP começou a fazer parte da regulamentação europeia,

tendo por base de aplicação os princípios expressos no *Codex Alimentarius*, sendo estes os seguintes⁹:

- 1. Identificação dos perigos e medidas preventivas:** identificar quaisquer perigos que devam ser evitados, eliminados ou reduzidos para níveis aceitáveis;
- 2. Identificação dos pontos críticos de controlo (PCCs):** identificar os PCCs na fase ou fases em que o controlo é essencial para evitar ou eliminar um risco ou para o reduzir para níveis aceitáveis;
- 3. Estabelecimento dos limites críticos para cada medida associada a cada PCC:** estabelecer limites críticos nos PCCs que separem a aceitabilidade da não aceitabilidade com vista à prevenção, eliminação ou redução dos riscos identificados;
- 4. Estabelecimento do sistema para monitorizar/controlar cada PCC:** estabelecer e aplicar processos eficazes de vigilância em PCCs;
- 5. Estabelecimento de medidas corretivas para cada caso de limite em desvio:** estabelecer medidas corretivas quando a vigilância indicar que um ponto crítico não se encontra sob controlo;
- 6. Estabelecimento de procedimentos de verificação:** estabelecer processos, a efetuar regularmente, para verificar se as medidas referidas nos princípios 1 a 5 funcionam eficazmente;
- 7. Criação de um sistema de registo para todos os controlos efetuados:** elaborar documentos e registos adequados à natureza e dimensão das empresas, a fim de demonstrar a aplicação eficaz das medidas referidas nos princípios 1 a 6.

O instrumento legal em vigor é o Regulamento (CE) nº852/2004 de 29 de Abril, que surge com uma grande relevância, pois incorpora as boas práticas recomendadas pelo *Codex Alimentarius*, estabelece os requisitos gerais de higiene no setor alimentar e obriga à implementação do Sistema HACCP, assim como à responsabilização dos operadores do setor pela segurança alimentar⁹. Para se poder realizar uma aplicação efetiva do Sistema HACCP devem ser tidos em conta os pré-requisitos existentes no referido regulamento de forma a prevenir, eliminar ou reduzir os perigos que podem vir a contaminar os alimentos durante o seu processo de produção e posterior distribuição⁷. Enquanto o sistema HACCP controla os perigos relacionados com o processo de produção, os pré-requisitos controlam os perigos associados ao meio envolvente ao

processo de produção do género alimentício⁹. Os pré-requisitos que devem ser considerados são os seguintes¹⁰:

1. Estruturas e Equipamentos;
2. Plano de Higienização;
3. Controlo de Pragas;
4. Abastecimento de água;
5. Recolha de resíduos;
6. Materiais em contacto com alimentos;
7. Higiene pessoal;
8. Formação.

2.2. Perigos alimentares

O problema que mais põe em causa a segurança e qualidade alimentar é a contaminação de alimentos devido a perigos existentes no meio ambiente. De acordo com o *Codex Alimentarius*, um perigo alimentar é definido como “um agente biológico, químico ou físico presente num alimento ou situação por ele causada, que tenha um efeito adverso na saúde do consumidor”⁸. Os perigos podem ser classificados de acordo com a sua natureza, sendo normalmente agrupados em três categorias: biológicos, químicos e físicos. As principais causas para a ocorrência dos diferentes tipos de perigos são¹¹:

1. Exposição dos alimentos a temperaturas de risco;
2. Manuseamento por pessoas não obedecendo às regras básicas de higiene pessoal;
3. Exposição dos alimentos a agentes causadores da doença/ferimento por contaminação direta ou contaminação cruzada.

Entre os três tipos de perigos, os perigos biológicos são os que apresentam maior risco à inocuidade dos alimentos. Estima-se que cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos sejam provocadas por microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e parasitas patogénicos, bem como toxinas microbianas^{12,13}. Os microrganismos patogénicos são os perigos biológicos mais comuns e podem causar infeções (crescimento do microrganismo causador da doença) e intoxicações (a doença é causada pela toxina pré-formada, que é produzida pelo microrganismo)¹¹. Estes perigos podem ser encontrados em quase todos os alimentos, mas a sua transmissão resulta, na maioria dos

casos, da utilização de metodologias erradas nas últimas etapas da sua confeção ou distribuição, bem como vindos de produtos crus contaminados utilizados como matéria-prima^{12,13}. Os microrganismos podem ainda desenvolver-se naturalmente no ambiente onde os alimentos são produzidos se as condições existentes foram favoráveis ao seu crescimento. Contudo, este crescimento pode ser controlado por práticas adequadas de manipulação e armazenamento, boas práticas de higiene e de fabrico e controlo do ambiente dos processos de produção, como por exemplo controlo do tempo e temperatura¹³.

Na categoria de perigos químicos fazem parte um grande número de substâncias químicas tóxicas que podem ocorrer nos alimentos de diversas formas e em qualquer etapa da sua produção, desde o cultivo das matérias-primas até ao consumo do produto acabado¹¹. Estes perigos podem estar associados diretamente às características das matérias-primas ou ser criados ou introduzidos no produto durante o processo de produção. Como perigos químicos, existem compostos usados nos processos de produção primária (ex. pesticidas e medicamentos veterinários como antibióticos e promotores de crescimento) que podem deixar resíduos ou aditivos usados na transformação (como por exemplo os sulfitos e nitritos) que, se usados em quantidades indevidas, tornam-se nocivos^{12,13}. Há perigos químicos que podem aparecer de forma não intencional nos alimentos, ou se, não foram diretamente adicionados, como é o caso dos contaminantes de origem industrial (p.e. dioxinas e metais pesados), as toxinas produzidas por fungos, algas e algumas plantas, e alergénios (p.e. glúten e soja) e também contaminantes introduzidos durante o processo (p.e. produtos de limpeza e desinfeção)^{12,13}. O efeito da contaminação química no consumidor pode ser crónico devido ao contacto continuado com contaminantes existentes em baixas quantidades, bem como pode ser agudo, aquando o contacto a curto prazo com contaminantes em quantidades elevadas⁷. Como forma de evitar a contaminação com estes perigos é importante manter os controlos das cadeias de fornecimento de matérias-primas em vigor, bem como controlar os produtos químicos utilizados na limpeza e os procedimentos de armazenamento e manuseio⁷.

Os perigos classificados como físicos podem apresentar origens diversas, desde objetos que podem estar presentes nas matérias-primas até objetos que podem ser introduzidos nos produtos alimentares por via da manipulação a que os alimentos estão sujeitos ao longo do seu processo de produção¹³. Na maioria das vezes estes perigos provêm dos materiais das embalagens, dos equipamentos ou utensílios e dos próprios

manipuladores de alimentos e matérias-primas. Os objetos mais frequentemente encontrados como contaminantes são: vidros, pedras, metais, madeiras, materiais de isolamento ou de revestimento, ossos, plásticos e objetos de uso pessoal⁷. Embora, na maioria dos casos, a presença de objetos estranhos não represente um risco grave para a saúde do consumidor, pode sê-lo. Este tipo de perigo é caracterizado por provocar efeitos imediatos se ingeridos pelo consumidor, podendo causar lesões mecânicas no aparelho digestivo de que são exemplos a quebra de dentes, cortes ou perfuração de mucosas¹⁴. A presença destes perigos nos alimentos indica, na maioria das vezes, falhas no sistema de segurança alimentar e de boas práticas de fabrico e higiene. Deste modo, o seu aparecimento pode ser controlado por uma inspeção cuidadosa e boas práticas aplicadas pelo produtor e até mesmo pelo consumidor¹³.

Em qualquer processo de produção alimentar, após a identificação dos perigos existentes, estes são normalmente caracterizados de acordo com os seguintes fatores¹¹:

- Severidade do(s) perigo(s), incluindo o grau de severidade das consequências da exposição ao perigo ou a magnitude e duração da doença ou ferimento;
- A probabilidade de ocorrência do(s) perigo(s), com base em dados publicados e em dados epidemiológicos;
- Potencial para ocorrência de efeitos a curto e a longo prazo;
- Outros dados para avaliação do risco associado ao perigo em causa (degradabilidade, forma de uso, população alvo).

2.3. Deterioração microbiológica em produtos de panificação

A deterioração de alimentos é caracterizada por qualquer alteração no alimento que o torne inaceitável pelo consumidor do ponto de vista sensorial. Essas alterações podem ser físicas, químicas, de sabor e odor, resultantes do crescimento e metabolismo de uma grande variedade de microrganismos no produto. A deterioração microbiana é a causa mais comum de deterioração de alimentos, incluindo os produtos de panificação, e pode manifestar-se com o crescimento visível de colónias, bem como com alterações na textura ou aparecimento de odores e sabores desagradáveis¹⁵. Nos produtos de panificação este tipo de deterioração é o principal fator que limita o seu prazo de validade

e também é uma das principais causas de perdas económicas para as indústrias e para o próprio consumidor e que pode também pôr em causa a sua saúde¹⁶.

A deterioração microbiológica dos produtos de panificação é maioritariamente influenciada por fatores inter-relacionados que vão, por sua vez, influenciar o crescimento de microrganismos. Esses fatores são, nomeadamente, a temperatura de armazenamento, a humidade relativa, a concentração de conservantes e disponibilidade de nutrientes, o pH, a atividade da água (a_w), o material da embalagem e a composição da atmosfera em que o produto está embalado¹⁶. Estes fatores, sozinhos ou em combinação uns com os outros, podem conduzir a mudanças prejudiciais na cor, odor, sabor e textura dos alimentos. Os produtos de panificação podem ser classificados de acordo com a sua a_w , como de a_w baixa (<0,6), a_w intermédia (entre 0,6 e 0,85) e a_w elevada (>0,85)¹⁷. Os croissants e bolos recheados que são objeto do presente estudo e que foram mencionados na secção 1 apresentam uma a_w entre 0,75 e 0,88, podendo por isso ser classificados como produtos de panificação de a_w intermédia a alta. Deste modo, os microrganismos de deterioração que mais se desenvolvem nestes produtos são leveduras e bolores osmofílicos. Os produtos recheados estão também sujeitos a outros tipos de deterioração microbiana, pois alguns recheios, que têm na sua composição ovos e laticínios, podem potenciar o crescimento de microrganismos patogénicos¹⁶. No entanto, a contaminação deste tipo de produtos tem lugar predominantemente após a cozedura, através de esporos de bolores que se encontram no ar ambiente das instalações de produção e que se depositam na superfície dos alimentos. Os ingredientes, equipamentos, utensílios e materiais das embalagens, quando contaminados, também podem representar pontos de contaminação. Para além da visão desagradável do crescimento visível de fungos, estes também são responsáveis pela produção de micotoxinas e sabores que podem ser produzidos mesmo antes do crescimento de fungos ser visível¹⁸. Deste modo, a deterioração microbiológica representa um risco que pode ser alto para a saúde do consumidor, logo o controlo dos fatores que possam comprometer a segurança e qualidade destes produtos é fundamental.

2.3.1. Fatores que afetam o crescimento de microrganismos

A flora microbiana que coloniza um determinado alimento depende muito das características do produto e da maneira como é processado e armazenado. Os parâmetros que afetam a proliferação de microrganismos nos alimentos podem ser classificados como

fatores intrínsecos ou extrínsecos. Os parâmetros intrínsecos são as propriedades físicas, químicas e estruturais inerentes ao próprio alimento, como por exemplo a atividade da água, o pH e os nutrientes disponíveis. Os parâmetros extrínsecos são fatores característicos do ambiente em que o alimento é armazenado, como a temperatura, a humidade relativa e a presença e concentração de gases¹⁹.

2.3.1.1. Fatores intrínsecos

Atividade da água

Os microrganismos necessitam de água para crescer. As suas exigências em água são medidas em termos de água livre ou de atividade da água (a_w). A a_w é definida pela razão entre a pressão de vapor de água do alimento e a pressão de vapor da água pura à mesma temperatura e pressão, $a_w=p/p_0$, onde p é a pressão de vapor da solução e p_0 é a pressão de vapor da água pura. A a_w da água pura é 1, enquanto a a_w de um produto completamente desidratado ou sem água disponível é 0. A a_w , sendo uma indicação da quantidade de água disponível para uso biológico, determina se e quais microrganismos podem crescer num alimento. Assim, a limitação da atividade da água pode ser uma ferramenta significativa para preservar alimentos e inibir o crescimento microbiano^{20,21}.

A a_w ideal para o crescimento da grande maioria dos microrganismos de deterioração é superior a 0,90 e o mínimo está entre 0,80 e 0,90. De uma forma geral, as bactérias necessitam de valores mais elevados de a_w para crescerem do que os fungos (leveduras e bolores). Deste modo, o valor da a_w dos alimentos determina em grande parte o tipo de organismos que se podem desenvolver. Existem alguns grupos de microrganismos que podem crescer com atividades da água mais reduzidas, ou seja, entre 0,60 e 0,75. Esses grupos são denominados de xerófilos, halófilos e osmófilos. Os microrganismos xerófilos, na sua maioria bolores, são caracterizados por proliferarem em ambientes secos, podendo crescer com valores de a_w abaixo de 0,60. Os microrganismos halófilos, normalmente bactérias, requerem uma concentração mínima de sal para se desenvolverem, sendo por isso classificados de acordo com as suas necessidades e tolerância ao sal. Os microrganismos osmófilos são geralmente leveduras que têm a capacidade de crescer em elevadas concentrações de açúcar, podendo também ser denominadas de osmotolerantes. A a_w pode ser manipulada nos alimentos através de várias formas, incluindo adição de solutos, como sal ou açúcar, remoção física da água

por desidratação ou cozimento, ou ligação da água a vários componentes macromoleculares nos alimentos^{11,20,22}.

pH

Os microrganismos crescem numa ampla gama de pH, que se estende entre 1,0 e 11,0. Contudo, está bem estabelecido que a maioria cresce melhor a pH neutro (6,6-7,5). No entanto, muitos microrganismos são capazes de crescer em ambientes mais ácidos ou mais alcalinos e nos alimentos a gama de crescimento é bastante ampla (4,0-9,5). Os bolores apresentam a gama mais ampla de pH a que se conseguem desenvolver, seguida pelas leveduras, enquanto as bactérias apresentam uma gama de crescimento de pH mais restrita. Os organismos que têm a capacidade de crescer em pH baixo são denominados de acidófilos. Muitos fungos são considerados acidófilos, pois apresentam crescimento ótimo a pH 5 ou inferior, como a pH 2. Algumas bactérias são também consideradas acidófilas, algumas até acidófilas obrigatórias, não se desenvolvendo a pH neutro. Alguns microrganismos extremófilos apresentam valores elevados de pH ótimo, o qual, às vezes atinge o pH 10, sendo por isso conhecidos como alcalifílicos. Deste modo o pH é um parâmetro que nos alimentos também pode ser manipulado de forma a controlar o crescimento de microrganismos deteriorantes²⁰⁻²².

Conteúdo em nutrientes

Os microrganismos requerem nutrientes básicos para o seu crescimento e para manterem as suas funções metabólicas. Esses nutrientes incluem: água, fontes de energia e de nitrogénio, vitaminas e minerais. Como fontes de energia e nitrogénio, os microrganismos usam hidratos de carbono, proteínas e lípidos. Quase todos têm a capacidade de utilizar açúcares simples, presentes nos alimentos, como fontes de energia, incluindo glucose, frutose, sacarose e maltose. Apenas alguns microrganismos, como os bolores, que produzem enzimas extracelulares (amilases, lipases e proteases) podem utilizar macromoléculas como fontes de energia. As fontes primárias de nitrogénio utilizadas pelos microrganismos são os aminoácidos livres ou os resultantes da hidrólise de peptídeos e proteínas. Deste modo, os microrganismos que geralmente têm capacidade de se desenvolver nos alimentos são aqueles que podem mais facilmente utilizar os nutrientes presentes nesses alimentos^{11,20,21}.

2.3.1.2. Fatores extrínsecos

Temperatura

Os microrganismos, individualmente ou em grupo, crescem numa faixa bastante ampla de temperatura. Deste modo torna-se importante considerar quais as gamas de temperatura que vão favorecer o crescimento dos microrganismos importantes nos alimentos, para assim se definir quais as melhores temperaturas de armazenamento. De acordo com as exigências de temperatura para o crescimento de cada microrganismo, estes podem ser classificados como psicrófilos, psicrotróficos, mesófilos e termófilos. Os microrganismos psicrófilos apresentam uma gama ideal de crescimento entre os 0 e os 20°C, sendo o ideal de 15°C. Os microrganismos psicrotróficos têm um crescimento ideal a temperaturas superiores a 20°C e são ainda capazes de crescer a uma temperatura de refrigeração entre 0 e 7°C. Já os mesófilos apresentam um crescimento ideal a uma temperatura entre 30 e 37°C e uma gama geral de crescimento de 20-45°C. Os microrganismos termófilos crescem a uma temperatura ideal entre os 45 e os 60°C. A maioria dos microrganismos patogénicos produtores de toxinas e os patogénicos infecciosos são classificados como mesófilos, logo a temperatura de armazenamento de alimentos perecíveis pode ser usada para minimizar o crescimento destes microrganismos^{11,20-22}.

Humidade relativa

A humidade relativa do ambiente de armazenamento é importante no que toca à a_w do alimento, condicionando o desenvolvimento da microflora de superfície no alimento. Quando alimentos com valores de a_w baixos são colocados em ambientes com alta humidade relativa, vão absorver água até que o equilíbrio seja estabelecido, o que pode favorecer o crescimento de microrganismos na superfície. Por outro lado, quando os alimentos com elevada a_w são colocados em atmosferas com baixa humidade, vai ocorrer a sua desidratação o que, embora possa não prejudicar o alimento microbiologicamente, pode levar a alterações organoléticas e de textura. Contudo, os alimentos que sofrem frequentemente deterioração da superfície por bolores, leveduras e bactérias devem ser armazenados em condições de baixa humidade relativa^{11,20,21}.

Presença e concentração de gases

Os microrganismos necessitam de diferentes concentrações de oxigénio para se desenvolverem e sobreviverem. Os microrganismos podem ser classificados de acordo com a sua necessidade de oxigénio. Existem microrganismos aeróbios, em que o seu crescimento depende da presença de oxigénio, os anaeróbios, que não crescem na presença de oxigénio e também os anaeróbios facultativos, que têm a capacidade de se multiplicarem quer em condições aeróbicas quer anaeróbicas. Deste modo, a composição de gases no armazenamento dos alimentos tem grande efeito nos microrganismos que têm a capacidade para aí se desenvolverem. Para além do oxigénio que é utilizado na conservação de alimentos como as carnes frescas de aves e porco, são utilizados também o dióxido de carbono e o azoto em alimentos como o pão. O dióxido de carbono é um gás eficaz contra microrganismos aeróbios obrigatórios e em níveis elevados pode impedir o crescimento de anaeróbios. Deste modo, existem várias formas de conservação de alimentos que têm como principal técnica a mudança da atmosfera que os envolve^{11,20-22}.

2.3.2. Microrganismos causadores de deterioração em produtos de panificação

Os alimentos estão sujeitos à contaminação por um vasto grupo de microrganismos que, sob algumas condições, podem contribuir para a deterioração dos alimentos, nomeadamente dos produtos de panificação. Os diversos microrganismos podem produzir moléculas que podem alterar quer a qualidade nutricional quer a qualidade sensorial dos alimentos, em particular a cor, a textura e o odor¹⁵. Com base na composição nutricional do alimento e nas suas características físicas e químicas, alguns microrganismos irão prevalecer em detrimento de outros. Particularmente nos produtos de panificação com recheio, devido ao seu a_w intermédio a alto e aos elevados níveis de açúcares, a sua deterioração é caracterizada pelo crescimento de leveduras e de bolores osmofílicos e em menor extensão de bactérias patogénicas²³.

2.3.2.1. Bactérias

As bactérias são os organismos menos prováveis de ocorrer em produtos de panificação/pastelaria, como é o caso dos bolos cilíndricos e croissants, pois desenvolvem-se maioritariamente em produtos com alto teor de água livre (a_w entre 0,94

e 0,99)¹⁶. Contudo, devido à a_w destes produtos não ser assim tão baixa, é necessária ter atenção com a contaminação por parte destes microrganismos. Algumas das espécies que se podem desenvolver são *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes*, que são dos principais microrganismos patogénicos ambientais, bem como *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, que são bactérias capazes de produzir toxinas estáveis ao calor²⁰.

A *Salmonella spp.* apresenta milhares de estirpes, todas elas consideradas patogénicas e, por isso, não é tolerada a sua presença em nenhum alimento pronto para consumo²⁴. Estas bactérias são capazes de causar infeção do sistema gastrointestinal, denominada de salmonelose. A dose infecciosa é bastante baixa, sendo apenas necessárias 10 a 25 células para causar a doença e por esta razão não precisam de crescer no alimento. Este facto, juntamente com a boa adaptação destas bactérias a sobreviverem em condições secas, aumenta o risco para o seu desenvolvimento em produtos alimentícios de baixa a_w ^{11,20,25}.

A *Listeria monocytogenes* tem a capacidade de causar infeções por listeriose, que podem levar a doenças semelhantes à gripe. A dose infecciosa é considerada > 100-1000 células por grama nos alimentos consumidos, sendo esta bactéria um risco grande em alimentos em que pode crescer. A *L. monocytogenes*, por ser uma bactéria psicotrófica, pode desenvolver-se em ambientes frios e é um risco para alimentos refrigerados com elevada humidade. Já para alimentos com baixa humidade este risco é menor^{11,20,25}.

Relativamente à *Bacillus cereus*, esta é uma bactéria formadora de endosporos resistentes ao calor, que suportam temperaturas de cozimento próximas dos 100°C durante vários minutos²⁶. As doenças transmitidas por esta bactéria ocorrem quando os alimentos são cozidos e refrigerados inadequadamente, permitindo a germinação dos endosporos e o subsequente crescimento e produção de enterotoxinas, também resistentes ao calor. A *B. cereus* pode desenvolver-se em valores de pH entre 4,3 e 9,3 e a_w abaixo de 0,91 e está frequentemente associada à refrigeração inadequada de alimentos ricos em amido. A sua presença é frequentemente associada às matérias-primas utilizadas^{22,25,26}. Em alimentos prontos para consumo é considerado que a *B. cereus* não deve estar presente em níveis que excedam as 10⁵ UFC/g²⁴.

A *Staphylococcus aureus* é capaz de produzir uma enterotoxina altamente estável ao calor e crescer em atividade de água mais baixa do que outros microrganismos patogénicos, sendo capaz de se desenvolver em alimentos com a_w até 0,87. Esta bactéria,

se presente num alimento que permaneça à temperatura ambiente por longos períodos, forma as suas toxinas que podem criar um risco de intoxicação por ingestão. Nos recheios de pastelaria é característico o desenvolvimento de *S. aureus*^{11,22,25}. Em alimentos prontos para consumo estas bactérias não devem estar presentes em níveis que excedam as 10⁴ UFC/g²⁴.

2.3.2.2. Leveduras

Em produtos de panificação, a contaminação por leveduras pode ocorrer por²⁷:

- i. crescimento visível de leveduras na superfície dos produtos (manchas brancas ou rosa);
- ii. deterioração fermentativa de uma ampla gama de produtos ou ingredientes, manifestada por odores alcoólicos, acéticos, entre outros e/ou evidência visível da produção de gás, como bolhas de gás em geleias e cremes ou expansão de embalagens flexíveis.

O crescimento visível de leveduras está mais associado a produtos de a_w elevado e vida útil curta, enquanto a deterioração fermentativa é geralmente associada a produtos de baixa a_w e uma vida útil mais extensa²⁷. Algumas das espécies responsáveis pela deterioração superficial dos produtos incluem *Pichia burtonii*, *Hyphopichia sp.* e *Endomycolopsis burtonii*²⁸. A deterioração fermentativa é muitas vezes associada aos cremes usados como recheio nos produtos de panificação/confeitaria, que contêm elevadas concentrações de açúcar. Por esta razão, os cremes são um bom substrato para o crescimento de leveduras capazes de tolerar condições de baixa a_w e elevado stress osmótico. As espécies típicas de leveduras osmotolerantes capazes de causar deterioração pertencem aos géneros *Debaryomyces*, *Pichia* e *Zygosaccharomyces*. Entre estes géneros, o *Zygosaccharomyces* é o mais comumente associado à deterioração de produtos ricos em açúcar, uma vez que é resistente a conservantes²⁹. Para além disto, outros géneros são comuns de causar contaminação quando os alimentos não são produzidos de acordo com boas práticas de higiene, como é o caso da *Candida*, *Brettanomyces*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torulopsis*³⁰. Dos metabolitos secundários produzidos pelas leveduras deteriorantes destacam-se os ácidos orgânicos²⁸, que podem ser responsáveis pelas alterações de acidez dos alimentos. As alterações no sabor podem dever-se maioritariamente ao ácido acético²⁹. O ambiente de produção, ou

seja, ar interno, superfícies e equipamentos são as principais fontes de contaminação por leveduras. No entanto existem outras fontes também importantes a considerar como as matérias-primas utilizadas na produção dos alimentos, vetores que transmitem leveduras para as matérias-primas e a água utilizada na produção e na higienização dos espaços e equipamentos³¹. Em alimentos prontos para consumo como os produtos de pastelaria recheados, as leveduras não devem estar presentes em níveis que excedam 10^4 UFC/g para serem considerados seguros²⁴.

2.3.2.3. Bolores

A deterioração que mais limita o prazo de validade dos produtos de panificação de a_w média e alta é o crescimento de bolores. Muitos deles têm a capacidade de se desenvolver em valores de $a_w > 0,8$, existindo ainda os bolores xerofílicos que são capazes de crescer em produtos com a_w tão baixos como 0,65¹⁶. O gênero que mais contamina os produtos de panificação é *Penicillium* (90-100%), mas também ocorrem os *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cladosporium*³². O crescimento de bolores em alimentos pode resultar em vários tipos de deterioração, tais como produção de sabores e odores desagradáveis, de toxinas, ocorrência de descoloração e formação de propágulos patogênicos ou alergênicos. A deterioração das propriedades sensoriais é frequentemente devida à produção de exoenzimas durante o crescimento. Estes microrganismos podem produzir vários tipos de enzimas como lipases, proteases e glicanases que continuam a sua atividade mesmo depois de os bolores serem removidos dos alimentos³³.

As micotoxinas produzidas por bolores são metabolitos secundários que apresentam toxicidade para animais vertebrados em pequenas quantidades quando ingeridas ou inaladas. As micotoxinas podem interferir diretamente com a síntese de enzimas e proteínas, bem como induzir mutações em DNA celular, podendo levar à ocorrência de cancro e a supressão imunológica³⁴. As micotoxinas são formadas durante o crescimento dos bolores nos alimentos e a maioria delas é excretada após a sua produção. Muitas das micotoxinas conhecidas são muito resistentes a tratamentos físicos e químicos e por essa razão permanecem nos alimentos durante e após o seu processamento e armazenamento³⁵. De entre as mais de 300 micotoxinas conhecidas, nos produtos de panificação em particular destacam-se a ocratoxina A (OTA), o tricoteceno deoxivalenol (DON), a citrinina e a zearalenona³⁶. A OTA é produzida

maioritariamente por espécies de bolores dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* e é considerada uma toxina para os rins e fígado, sendo também um imunossupressor e um carcinogénico. Esta toxina tem a capacidade de perturbar a fisiologia celular a partir dos efeitos primários associados às enzimas envolvidas no metabolismo da fenilalanina, principalmente por inibir a enzima envolvida na síntese do complexo fenilalanina-RNA. Para além disso, inibe ainda a produção de ATP mitocondrial e estimula a peroxidação lipídica³⁷. O DON é produzido principalmente por espécies do género *Fusarium*. O principal efeito tóxico desta micotoxina é a inibição primária da síntese proteica, uma vez que tem a capacidade de se ligar à subunidade 60S dos ribossomas eucarióticos e interferir na atividade da peptidiltransferase^{38,39}. A citrinina é produzida por bolores do género *Penicillium* e é considerada uma nefrotoxina, podendo muitas vezes atuar sinergicamente com a OTA para suprimir a síntese de RNA nos rins³⁷. A zearalenona é produzida por bolores do género *Fusarium* e exibe atividade e estrutura semelhante ao estrogénio (17-estradiol). Apesar da zearalenona apresentar uma toxicidade aguda relativamente baixa, vai interferir fortemente com os recetores de estrogénio e, conseqüentemente, com o sistema reprodutor^{36,37,39}.

A principal forma de reprodução dos bolores é através de esporos, que ao germinarem formam as hifas. Estes esporos não são resistentes a tratamentos térmicos de temperaturas elevadas e por esta razão são eliminados após o cozimento dos produtos de panificação. No entanto, são facilmente transportados pelas correntes de ar, onde vão permanecer no ar ambiente das instalações, bem como em superfícies, equipamentos e manipuladores de alimentos, o que faz com que durante as etapas de transporte, arrefecimento e embalagem os alimentos possam ser contaminados. Deste modo, a contaminação por bolores resulta principalmente dos esporos existentes no ar⁴⁰. A contaminação por bolores pode ser evitada irradiando os alimentos com raios infravermelhos ou micro-ondas, usando atmosferas modificadas no armazenamento e embalagem dos produtos ou adicionando conservantes como o ácido propiónico, sórbico e benzóico⁴¹. Em alimentos prontos para consumo, onde se inserem este tipo de produtos de pastelaria recheados, para serem considerados seguros, os bolores não devem estar presentes em níveis que excedam 10^3 UFC/g²⁴.

2.3.3. Medidas preventivas para reduzir a probabilidade de contaminação com microrganismos e o seu crescimento

Existem inúmeros métodos novos e tradicionais na indústria de panificação e confeitaria para a redução de contaminantes dos produtos pós-processamento, são exemplos a luz UV, a radiação infravermelha, o aquecimento por micro-ondas e a tecnologia de alta pressão. Contudo, estes métodos não são ainda muito utilizados para prolongar a vida útil dos produtos. Em contrapartida, para atingir esse objetivo é mais prático, comum e económico controlar o crescimento de microrganismos deteriorantes pós-cozimento nos produtos embalados¹⁶. Isto pode ser alcançado através da reformulação dos produtos para reduzir o seu pH e a a_w , através do uso de conservantes adicionados diretamente ao produto e através da utilização de atmosfera modificada em redor do produto. Para além destas técnicas de conservação utilizadas nos alimentos, é igualmente importante ter em consideração outros parâmetros que vão também influenciar o desenvolvimento de contaminação microbiana nos alimentos. São eles o controlo das águas utilizadas na produção e na limpeza de equipamentos e superfícies que podem estar em contacto com os produtos, bem como a forma e técnicas utilizadas na higienização do ambiente fabril (ar e superfícies de trabalho).

2.3.3.1. Reformulação do produto

O prazo de validade microbiológico dos produtos de panificação que apresentam humidades relativamente mais elevadas está relacionado com dois aspetos particulares, o pH e a a_w . Deste modo, a reformulação dos produtos para reduzir tanto o pH como a a_w pode ser usada para aumentar o seu prazo de validade. A redução do pH pode ser alcançada através do uso de acidulantes, como ácidos orgânicos (p.e. ácido cítrico, láctico e acético) ou culturas de bactérias do ácido láctico, que produzem metabolitos que provocam esta redução^{16,42}. Já a redução da a_w pode ser alcançada pela adição de solutos, quer açúcares, quer sais⁴³. Contudo, existem limitações a estas técnicas, pois para controlar particularmente a deterioração de bolores, as concentrações de solutos que são necessários adicionar para ocorrer uma inibição eficaz, podem levar a alterações adversas nas propriedades sensoriais e de textura dos produtos. Deste modo, este é um aspeto que para ter resultados positivos tem de ser empregado de forma cautelosa e bem estudada.

2.3.3.2. Uso de conservantes

Na produção de alimentos o uso de conservantes é um meio atraente e simples de diminuir a deterioração e garantir a sua segurança. Os conservantes prolongam a vida útil dos alimentos, limitando o crescimento bacteriano e fúngico⁴⁴. No entanto, atualmente os consumidores não são a favor dos aditivos como conservantes e existe por isso um desejo de reduzir as quantidades usadas na indústria de panificação³². Por outro lado, a legislação restringiu o uso e os níveis permitidos de alguns conservantes atualmente utilizados em diferentes alimentos. Este facto criou alguns problemas para a indústria, porque a suscetibilidade de alguns microrganismos aos conservantes mais usados está a diminuir⁴⁵, o que pode levar, portanto, à estimulação do crescimento de fungos deteriorantes em alguns casos e da produção de micotoxinas³².

Os ácidos orgânicos fracos são usados como conservantes químicos desde há muitos anos em alimentos e bebidas. O dióxido de enxofre e os sulfitos continuam a ser o método escolhido para a preservação do vinho. Outros ácidos orgânicos fracos como o ácido acético, o ácido propiónico e, mais recentemente, o ácido sórbico e benzóico, também são amplamente utilizados em inúmeros alimentos⁴⁶. Estes conservantes são frequentemente adicionados aos alimentos na forma de sal devido ao facto de os sais serem mais solúveis em solução aquosa¹⁸. Por outro lado, estes ácidos orgânicos fracos tornam-se cada vez mais potentes como agentes antimicrobianos em valores de pH mais ácidos⁴⁶, o que significa que as suas moléculas não dissociadas apresentam maior atividade antimicrobiana que as respetivas moléculas dissociadas. Este facto deve-se às moléculas não dissociadas apresentarem maior capacidade de penetrar na membrana plasmática das células dos microrganismos. Uma vez intracelular, o ácido dissocia-se e, devido à libertação de prótons, o citoplasma é acidificado, o que provoca a inibição da glicólise e conseqüentemente o impedimento do crescimento dos microrganismos¹⁸. Uma redução do pH de 6,0 para 5,0 ou menos resulta num grande aumento relativo na proporção da forma não dissociada⁴⁷. Estudos *in vitro* demonstraram que o propionato de cálcio, o benzoato de sódio e o sorbato de potássio foram eficazes na inibição de alguns isolados de produtos de panificação a um pH de 4,5, quando aplicados a uma concentração de 0,3%, sendo o sorbato de potássio também eficaz numa concentração de 0,03%⁴⁷. No entanto, a adição destes sais de ácidos orgânicos fracos a um análogo de *sponge cake* de pH 6 apenas foi eficaz em níveis de a_w baixos (0,80-0,85)⁴⁸. O pH máximo para a atividade do sorbato é de 6,0 a 6,5, a do propionato é de 5,0 a 5,5 e para o benzoato

é de 4,0 a 4,5³². Deste modo, estes ácidos orgânicos fracos vão apresentar maior eficácia em produtos de panificação de pH mais baixo. Especificamente, o ácido propiônico inibe bolores e esporos de *Bacillus* mas não tem a capacidade de inibir leveduras na mesma extensão e, por isso, tem sido a escolha tradicional para a preservação do pão e outros produtos de panificação. O ácido sórbico é considerado mais eficaz que o anterior, inibindo ambos os microrganismos e também as leveduras e é usado numa ampla variedade de alimentos, incluindo também produtos de panificação específicos e produtos de confeitaria³². De acordo com a Diretiva nº95/2/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, relativa aos aditivos alimentares, os ácidos propiônico e sórbico podem ser adicionados aos produtos de panificação em concentrações de até 3000 ppm e 2000 ppm, respetivamente. O ácido benzóico é mais associado a outro tipo de produtos ácidos, como por exemplo frutas, mas pode ser também usado em conjunto com o ácido sórbico em produtos de confeitaria em concentrações até 1500 ppm⁴⁹.

As desvantagens relacionadas com o uso de conservantes químicos e a preferência dos consumidores por alimentos naturais sem esses conservantes, incentivaram o desenvolvimento de formas alternativas para controlar o crescimento de microrganismos deteriorantes e a formação de micotoxinas em alimentos. A preservação biológica refere-se ao aumento da vida útil e maior segurança dos alimentos utilizando microrganismos ou os seus metabolitos⁵⁰. A fermentação microbiana é um dos métodos mais antigos utilizados na conservação de alimentos. Em particular, nos produtos de panificação, os microrganismos mais amplamente utilizados como culturas iniciais deste processo, aplicados, por exemplo, na produção de massa fermentada, são as bactérias do ácido láctico (LAB)¹⁸. As LAB têm a capacidade de proporcionar efeitos positivos nos alimentos, como melhorar o sabor, a textura e as propriedades nutricionais. Por outro lado, estas bactérias ajudam ainda a prolongar o prazo de validade dos alimentos pois produzem metabolitos antimicrobianos com baixo peso molecular que consistem em ácidos orgânicos, ácidos gordos hidroxilados, dipeptídeos cíclicos, etanol, peróxido de hidrogénio, dióxido de carbono, diacetilo, bacteriocinas, antibióticos e compostos fenólicos^{51,52}. Entre os ácidos orgânicos, destacam-se o ácido láctico, acético, fenilático e p-OH-fenilático como tendo um papel significativo na inibição do crescimento de fungos e bactérias em produtos fermentados como o pão⁵². A atividade antifúngica das LAB ainda não está totalmente elucidada, contudo estas bactérias podem ser uma boa alternativa na redução da contaminação microbiana, dependendo sempre da estirpe das

LAB e das espécies e estirpes dos microrganismos deteriorantes⁵⁰. Um exemplo prende-se com a inibição do crescimento de *B. subtilis* em produtos de panificação por parte das LAB, que mostrou ser bastante eficaz⁵⁰.

2.3.3.3. Embalamento em atmosfera modificada

A deterioração dos alimentos pode ser reduzida através da modificação da atmosfera que se encontra em redor destes, de forma a reduzir a concentração de oxigénio, aumentando consideravelmente o seu prazo de validade. Este facto acontece devido principalmente a uma redução na taxa de oxidação pelo oxigénio e conseqüente redução no crescimento de microrganismos aeróbicos. O embalamento em atmosfera modificada (MAP, *Modified Atmosphere Packaging*) é uma das técnicas usadas para reduzir o oxigénio em redor dos alimentos⁵³. Esta técnica é muito utilizada no embalamento de produtos de panificação, sendo definida como “o embalamento de produtos alimentares num filme com uma boa barreira, no qual o ambiente gasoso é alterado para diminuir as taxas de respiração, reduzir o crescimento microbiológico e retardar a deterioração enzimática, com a intenção de prolongar a vida útil”⁵⁴. Mais detalhadamente, o MAP consiste na remoção do ar da embalagem do alimento e a sua substituição por um gás ou mistura de gases, onde a embalagem é logo de seguida selada a quente, o que vai aumentar o prazo de validade dos alimentos⁵⁵. O MAP controla ou reduz o crescimento de diversos microrganismos indesejáveis nos alimentos. Na sua maioria o crescimento de microrganismos aeróbicos é impedido em produtos embalados, enquanto os microrganismos anaeróbicos e anaeróbicos facultativos podem crescer, a menos que outras técnicas adicionais sejam usadas para controlar o seu crescimento⁵⁶.

A escolha da atmosfera específica a ser introduzida na embalagem depende de muitos fatores, como a flora microbiana ser capaz de crescer no alimento, a retenção da estabilidade deste, a prevenção da sua deterioração oxidativa, os requisitos de estabilidade da cor e a sua sensibilidade aos diferentes gases⁵⁵. Assim, os principais gases utilizados especificamente em produtos de panificação incluem o dióxido de carbono e o azoto. Estes dois gases são maioritariamente utilizados pois não são perigosos para a saúde humana e não são considerados aditivos alimentares⁵⁴. Relativamente ao azoto, este é um gás inerte que tem sido usado como gás de enchimento de embalagens para evitar o seu colapso, uma vez que apresenta uma baixa solubilidade em água e em lípidos em

comparação com o dióxido de carbono. Para além de evitar o colapso das embalagens, vai também permitir alcançar todos os efeitos da adição de dióxido de carbono⁵³. Por outro lado, o azoto é ainda usado para substituir o oxigénio de forma a inibir o crescimento de organismos aeróbicos⁵⁷. Já o dióxido de carbono é o gás mais importante em produtos de panificação embalados a gás⁵⁴. É considerado bacteriostático e fungistático, pois aumenta a fase de atraso e o tempo de geração durante a fase logarítmica de crescimento dos microrganismos. A eficácia do dióxido de carbono é influenciada pela sua concentração inicial e final, pela temperatura de armazenamento, pela flora microbiana presente e pelas características do produto. O crescimento microbiano é reduzido em altas concentrações de dióxido de carbono numa variedade de alimentos e esse efeito aumenta à medida que a temperatura de armazenamento diminui⁵³. No entanto, nem todos os microrganismos são sensíveis ao CO₂, como por exemplo as LAB, *C. perfringens* e *C. botulinum*. De uma forma geral o CO₂ é mais eficaz em alimentos onde os organismos de deterioração consistem em bactérias psicotrópicas gram-negativas e aeróbicas⁵⁷.

O MAP é usado em produtos de panificação para diminuir o crescimento dos microrganismos de deterioração deste tipo de produtos, tais como os bolores. O oxigénio é um elemento essencial que permite o crescimento rápido de bolores no produto ou que faz com que o recheio ou cobertura de um produto à base de manteiga se torne rapidamente rançoso⁵⁴. De acordo com estes factos e como forma de prevenção da deterioração por microrganismos em produtos de panificação, considera-se que bolos que contêm 0,07% de sorbato de potássio e embalados em 50% de CO₂ e 50% de N₂ apresentam um prazo de validade de 14 dias em temperatura ambiente. Numa mistura de 60% de CO₂ e 40% de N₂, o seu prazo de validade é aumentado para 30 dias se a temperatura for mantida abaixo dos 24°C⁵⁷. Como o CO₂ e o N₂ são dois gases eficazes na técnica do MAP, no que toca aos produtos de panificação as misturas mais recomendadas incluem 100% de CO₂ ou 100% de N₂⁵⁶.

2.3.3.4. Controlo das águas

A água é um ingrediente muito importante na produção de produtos de panificação ou pode entrar em contacto com qualquer produto por via da lavagem de equipamentos e superfícies por onde o produto passa. Deste modo, é fundamental o controlo da sua qualidade. É importante garantir que a água destinada ao consumo humano seja salubre,

limpa e desejavelmente equilibrada, na medida em que não contenha nenhum microrganismo, parasita ou substância em quantidade ou concentração que possa constituir um perigo potencial para a saúde humana⁵⁸. Deste modo, o Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto, estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, procedendo à revisão do Decreto-Lei n.º 243/2001, de 5 de Setembro, que transpôs para o ordenamento jurídico interno a Diretiva n.º 98/83/CE, do Conselho, de 3 de Novembro, tendo por objetivo “proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água e assegurar a disponibilização tendencialmente universal de água salubre, limpa e desejavelmente equilibrada na sua composição, estabelecendo ainda os critérios de repartição da responsabilidade pela gestão de um sistema de abastecimento público de água para consumo humano quando a mesma seja partilhada por duas ou mais entidades gestoras”⁵⁸.

Os valores paramétricos referentes à presença de microrganismos para a água destinada ao consumo humano utilizada numa empresa da indústria alimentar e descritos no Decreto-Lei⁵⁸ acima mencionado são os seguintes: *Escherichia coli* (*E. coli*) - 0 N/100 ml e *Enterococos* - 0 N/100 ml. Relativamente aos parâmetros químicos devem ser considerados os seguintes parâmetros com os respetivos limites: Acrilamida - 0,10 µg/l; Antimónio - 5,0 µg/l *Sb*; Arsénio - 10 µg/l *As*; Benzeno - 1,0 µg/l; Benzo(a)pireno - 0,010 µg/l; Boro - 1,0 mg/l *B*; Bromatos - 25 µg/l *BrO3*; Cádmio - 5,0 µg/l *Cd*; Crómio - 50 µg/l *Cr*; Cobre - 2,0 mg/l *Cu*; Cianetos - 50 µg/l *Cn*; 1,2 dicloroetano - 3,0 µg/l; Epicloridrina - 0,10 µg/l; Fluoretos - 1,5 mg/l *F*; Chumbo - 25 µg/l *Pb*; Mercúrio - 1 µg/l *Hg*; Níquel - 20 µg/l *Ni*; Nitratos - 50 mg/l *NO3*; Nitritos - 0,5 mg/l *NO2*; Pesticida individual - 0,10 µg/l; Pesticida total - 0,50 µg/l; Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) - 0,10 µg/l; Selénio - 10 µg/l *Se*; Tetracloroetano e tricloroetano - 10 µg/l; Trihalometanos - total (THM) - 150 µg/l; Cloreto de vinilo - 0,50 µg/l. Por sua vez, os parâmetros indicadores (parâmetros cujo valor deve ser considerado como valor guia, nos termos do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto) incluem: Alumínio - 200 µg/l *Al*; Amónio - 0,50 mg/l *NH4*; Cálcio - mg/l *Ca*; Cloretos - 250 mg/l *Cl*; *Clostridium perfringens* (incluindo esporos) - 0 N/100 ml; Cor - 20 mg/l *PtCo*; Condutividade - 2 500 µS/cm a 20°C; Dureza total - mg/l *CaCO3*; pH - $\geq 6,5$ e ≤ 9 unidades de *pH*; Ferro - 200 µg/l *Fe*; Magnésio - mg/l *Mg*; Manganês - 50 µg/l *Mn*; Microcistinas — LR total - 1 µg/l; Cheiro, a 25°C - 3 Factor de diluição; Oxidabilidade - 5 mg/l *O2*; Sulfatos - 250 mg/l *SO4*; Sódio - 200 mg/l *Na*; Sabor, a 25°C - 3 Fator de diluição; Número de colónias - Sem alteração anormal N/ml a 22°C;

Número de colónias - Sem alteração anormal N/ml a 37°C; Bactérias coliformes - 0 N/100 ml; Carbono orgânico total (COT) - Sem alteração anormal mg/l C; Turvação - 4 UNT; α -total - 0,5 Bq/l; β -total - 1 Bq/l; Trítio - 100 Bq/l; Dose indicativa total - 0,10 mSv/ano; Desinfetante residual - mg/l. Deste modo, para o correto controlo e utilização da água utilizada nas produções e para limpeza de equipamentos e superfícies, todos estes parâmetros têm de ser avaliados e encontrar-se em conformidade com os respetivos limites.

2.3.3.5. Higienização

Como o ambiente de produção e processamento de alimentos é uma das principais fontes de contaminação, sendo o ar um importante disseminador de esporos de fungos, o controlo higiénico do ambiente fabril, ar e superfícies de trabalho, é uma das maneiras de evitar o problema de deterioração precoce dos alimentos por microrganismos⁵⁹. A higienização é a aplicação de métodos específicos ou substâncias a uma superfície limpa para destruir microrganismos patogénicos e mesmo não patogénicos, de forma a reduzi-los para níveis considerados seguros do ponto de vista da saúde pública⁴³. Contudo, este conceito de higienização não pode ser separado do conceito de limpeza, pois é impossível higienizar uma superfície se esta ainda se encontrar suja. Assim, a higienização é uma etapa importante, mas não pode ser alcançada sem as etapas anteriores de limpeza⁶⁰.

A limpeza consiste na remoção da sujidade encontrada nas superfícies e evita a acumulação de resíduos alimentares que podem decompor-se ou levar ao crescimento de microrganismos deteriorantes⁶¹. A sujidade num sistema de processamento de alimentos é composta de matéria orgânica (proteínas, gorduras e hidratos de carbono) e de matéria inorgânica. Assim, os agentes de limpeza ou detergentes são compostos químicos, quelantes, ácidos, entre outros, que vão remover a matéria orgânica e inorgânica, deixando as superfícies limpas, mas não totalmente desinfetadas⁶². Assim, procedem-se depois às técnicas de higienização que vão destruir microrganismos patogénicos e outros para níveis aceitáveis pelas autoridades sanitárias.

Na higienização são utilizados desinfetantes que, após a aplicação dos detergentes, vão ter o principal papel de eliminar microrganismos indesejáveis existentes nas superfícies. Os desinfetantes são produtos químicos que para serem considerados como tal devem reduzir a população dos organismos *S. aureus* e *E. coli*, em 99,999%, dentro

de 30 segundos, após a aplicação a 20°C⁴³. São utilizados muitos desinfetantes químicos no processo de higienização, como os halogénios (compostos de cloro e de iodo), compostos quaternários de amónia e vários ácidos⁴³. Mais concretamente, aqueles que geralmente são autorizados pelas autoridades reguladoras e usados pelas indústrias de alimentos são o cloreto de benzalcónio, a biguanida, o ácido peracético, a amónia quaternária e o hipoclorito de sódio, além de outros produtos à base de compostos fenólicos⁵⁹. O ácido peracético mostrou ser o desinfetante com melhor atividade antifúngica perante os fungos geralmente deteriorantes de produtos de panificação, seguido do cloreto de benzalcónio⁵⁹. Em contrapartida o hipoclorito de sódio e a biguanida não demonstraram atividade antifúngica adequada e não foram considerados bons desinfetantes para o controlo de fungos nas indústrias de panificação.

O processo de higienização, para ser bem-sucedido e ter resultados positivos na segurança dos alimentos, depende não só das características dos desinfetantes utilizados e do modo como são empregados, mas também das características dos microrganismos presentes no local. Os biofilmes são exemplos de incrustações ligadas às superfícies de equipamentos e que são identificadas como um conjunto de células microbianas, incluindo patogénicas, envolvidas em substâncias poliméricas extracelulares (EPS - *extracellular polymeric substances*) hidratadas. As EPS são caracterizadas por matéria orgânica e inorgânica, como polissacarídeos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, entre outros⁶³. Os biofilmes podem ser bastante resistentes a alguns desinfetantes, em comparação com as células dispersas livremente em solução⁶¹. Este facto deve-se principalmente à possibilidade de os desinfetantes perderem a sua eficácia quando atingem os microrganismos, uma vez que podem reagir primeiramente com a matéria orgânica do biofilme⁶². Deste modo, a ligação de microrganismos patogénicos a superfícies de contacto com alimentos, formando biofilmes, pode levar a potenciais problemas de higiene, pois estes fornecem um reservatório de contaminação. De forma a que os biofilmes sejam removidos efetivamente e o seu possível desenvolvimento controlado, é importante conhecer a sua localização para que os agentes de limpeza cheguem aos locais onde se encontram e removam o biofilme e, conseqüentemente, o desinfetante, durante o processo de higienização, elimine o máximo de conteúdo microbiano^{61,62}. Para tal, é muito importante desenvolver métodos de limpeza e desinfecção, bem como sistemas de controlo em ambientes de processamento de alimentos. Deste modo, as Boas Práticas de Fabricação (GMP - *Good Manufacturing*

Practice) e o Plano HACCP foram estabelecidos com o objetivo de controlar a qualidade e a segurança dos alimentos, bem como os procedimentos de limpeza no local (CIP - *Cleaning-in-place*) onde são aplicadas todas as técnicas de higienização⁶³.

3. Enquadramento do trabalho de estágio em ambiente empresarial

São muitos os fatores que influenciam e que levam ao aparecimento de contaminações e ao crescimento de microrganismos patogénicos nos alimentos, bem como são várias as medidas que podem ser tomadas para reduzir essa probabilidade. Nos produtos de panificação/confeitaria mencionados, o maior problema encontrado foi o aparecimento de contaminação biológica, mais propriamente de bolores, após algum tempo de armazenamento, mas ainda dentro do prazo de validade. Após reunir toda a informação acerca do estado de arte deste tema, percebeu-se que são vários os parâmetros que podem ser estudados e avaliados de forma a se conseguir proceder à melhoria da qualidade destes produtos. Ficou-se a perceber que fatores intrínsecos e extrínsecos aos produtos, como a atividade da água, pH e humidade relativa, composição atmosférica das embalagens, influenciam bastante o aparecimento de microrganismos, bem como a higienização da linha de produção e ambiente fabril. Deste modo, o trabalho prático realizado centrou-se na pesquisa e análise de possíveis fontes e pontos de contaminação em toda a linha de produção dos bolos e croissants, olhando em especial para o ar ambiente e para a higienização de equipamentos e superfícies. Analisaram-se ainda parâmetros como o pH, a atividade da água, a humidade relativa e o correto embalamento dos produtos em atmosfera modificada, que poderiam de alguma forma influenciar o desenvolvimento de bolores.

4. Análises de controlo de qualidade

As análises de controlo de qualidade realizadas na empresa, referentes ao bolos e croissants produzidos, dividiram-se em controlo analítico e controlo microbiológico e tiveram como principal objetivo garantir a segurança e qualidade dos produtos produzidos. O controlo analítico é realizado ao longo de todas as produções pelos analistas e no controlo microbiológico é realizado um estudo para todas as produções ao longo de 16 semanas, chamado de Estudo de Vida Útil.

4.1. Controlo Analítico

O controlo analítico realizado ao longo de todas as produções baseia-se na análise de parâmetros específicos relativos ao produto nas suas duas principais fases, produto intermédio (cozido e sem recheio) e produto acabado, bem como na análise de parâmetros específicos relativos aos cremes e às madres (fermento natural). Na tabela 3 são identificados os diferentes parâmetros analíticos que são avaliados nas diferentes fases do produto. São ainda analisadas as matérias-primas utilizadas na produção das massas e cremes. Estes controlos visam a obtenção de um produto com qualidade e de acordo com os parâmetros estabelecidos.

Tabela 3 - Parâmetros analíticos avaliados em cada fase do produto (produto intermédio e produto acabado), cremes e madres.

Produto Intermédio	Produto Acabado	Cremes	Madres
Cor	pH	pH	pH
% Gordura	a_w	a_w	Temperatura
% Humidade	% Humidade	Viscosidade	Acidez
Temperatura	Comprimento		
	Peso		

No âmbito do controlo analítico, foram realizados controlos a diversos parâmetros relativos aos diferentes produtos. Todos estes controlos foram registados em documentos apropriados, fiáveis e de fácil acesso pela empresa.

4.1.1. Controlo do pH

O controlo do pH foi realizado às matérias-primas aquando da sua receção pela empresa, aos cremes após o tempo de armazenamento estipulado e aquando da sua utilização na produção e ao produto acabado de hora a hora ao longo de todas as produções.

O pH foi medido a partir de uma diluição de 10 g da amostra num copo com 90 mL de água destilada (100 mL no caso dos cremes) após 30 minutos de repouso. A leitura foi direta utilizando um medidor de pH de bancada Sartorius Docu-pH+ Meter (Figura 6).



Figura 6 – Representação de um medidor de pH de bancada Sartorius Docu-pH+ Meter

4.1.2. Controlo da atividade da água

A a_w foi medida nos cremes após o tempo de armazenamento estipulado e aquando da sua utilização na produção e no produto acabado de hora a hora ao longo das produções.

A a_w foi medida diretamente no creme e no produto moído, utilizando o aparelho de medição AquaLab Pre – Water Activity Analyzer (Figura 7). A leitura foi direta, registando-se o valor dado pelo aparelho.

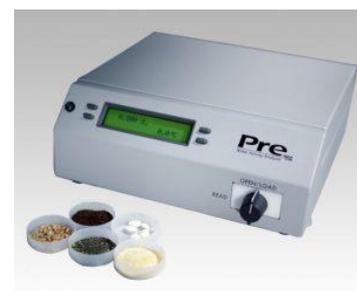


Figura 7 – Representação de um medidor da a_w AquaLab Pre – Water Activity Analyzer

4.1.3. Controlo da % de gordura e % de humidade

A % de gordura foi controlada apenas no produto intermédio (produto cozido e com recheio), enquanto a % de humidade foi controlada quer no produto intermédio quer no produto acabado. Estes dois parâmetros foram medidos a partir do equipamento InfraAlyser Zeutec SpectraAlyzer (Figura 8). Neste equipamento existem dois programas distintos, um para a medição da % de gordura e humidade do produto intermédio e outro para a medição da % de humidade do produto acabado.



Figura 8 – Representação do aparelho InfraAlyser Zeutec SpectraAlyzer

4.1.4. Controlo da viscosidade dos cremes

A viscosidade dos cremes foi analisada após o armazenamento. Este parâmetro é aquele que define se os cremes se encontram aptos para utilização, ou seja, se apresentam a consistência adequada para serem injetados nos bolos e croissants.

A viscosidade foi determinada a partir da utilização de um viscosímetro mecânico Brookfield Viscometer Model RVT (Figura 9) com o T respetivo para a viscosidade a determinar (neste caso o TD). O valor determinado para a viscosidade não é direto, logo o valor detetado no aparelho tem de ser multiplicado pelo coeficiente de 2000.

Quando os cremes apresentam um valor de viscosidade fora

da gama aceitável para utilização como recheio, estes são reprocessados ou armazenados no frio durante mais 4 dias, para que atinjam a consistência pretendida.



Figura 9 – Representação do viscosímetro mecânico Brookfield Viscometer Model RVT

4.1.5. Controlo da acidez das madres (fermento natural)

As madres utilizadas na produção da massa foram analisadas quanto à sua acidez uma vez por turno e 10 minutos antes de saírem para regeneração ou para a produção. Esta análise permite controlar o seu estado de fermentação.

A acidez foi medida a partir de uma titulação manual colorimétrica utilizando como indicador a fenolftaleína e como titulante uma solução de NaOH 0,4%.

4.1.6. Controlo da cor

O controlo da cor foi realizado ao produto intermédio após a cozedura. Esta medição foi feita nas duas extremidades do produto e no seu centro utilizando o aparelho Minolta Baking Metter BC-10 (Figura 10). O resultado surge em Bcu e corresponde à média direta das três leituras.



Figura 10 – Representação do aparelho de medição de cor Minolta Baking Metter BC-10

4.2. Controlo Microbiológico

O controlo microbiológico é realizado ao produto acabado ao longo de toda a sua vida útil (14 semanas + duas), às matérias-primas (soro de leite, farinha, cacau e gema de ovo), aos cremes e às águas utilizadas para consumo humano. São feitas análises a mesófilos (contagem total), coliformes, leveduras, bolores e enterobactérias. No caso específico das águas são feitas análises a mesófilos, coliformes e *enterococcus*. Para além disso, são ainda realizados inúmeros testes de superfície, com a utilização de zaragatoas, para verificação da correta higienização de equipamentos, superfícies e utensílios da linha de produção. Exceto para a água, estas análises são tratadas por contagem em placa por incorporação.

4.2.1. Amostragem

a) Recolha e preparação de amostras de produto acabado, cremes e matérias-primas

A recolha de amostras foi inicialmente realizada através de uma seleção. O produto acabado foi recolhido de acordo com o plano de recolhas definido para o ano em questão. Em relação às matérias-primas, estas foram recolhidas diretamente das suas embalagens e o ponto de recolha foi escolhido garantindo uma boa amostragem e o local de violação foi selado com uma etiqueta identificativa e destinada para o efeito. As amostras de produto acabado foram trituradas de forma homogénea, tendo sido utilizadas 10 g de amostra, que foram colocadas num frasco Schott com água peptonada.

b) Recolha e preparação de amostras de superfície

As amostras de superfície foram recolhidas com o auxílio de uma zaragatoa, sendo o recipiente preenchido com água peptonada. A zona de amostragem foi de 10 cm² e as análises foram efetuadas num período máximo de 2 dias.

c) Recolha de amostras de água

As amostras de água foram recolhidas em pontos específicos como torneiras de balneários, bebedouros, máquina do gelo, refrigerador e água utilizada na produção das

madres. Para as amostras recolhidas de torneiras, estas foram desinfetadas com álcool a 70% e flamejadas para eliminar qualquer tipo de microrganismos que possam aí se encontrar e pôr em causa a análise da água. A recolha das amostras foi feita em ambiente de assepsia, sempre com a chama acesa o mais próximo possível. Quer as águas quer o gelo foram colocados em frascos esterilizados e fechados.

4.2.2. Diluições

Para as análises feitas ao produto acabado, cremes, matérias-primas e também testes de superfície, foi necessário proceder à realização de três diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). Estas foram efetuadas de acordo com o diagrama apresentado na Figura 11.

Todas as operações de diluição devem ser realizadas em ambiente controlado e em máxima assepsia, ou seja, efetuada à chama ou dentro de uma câmara de fluxo laminar.

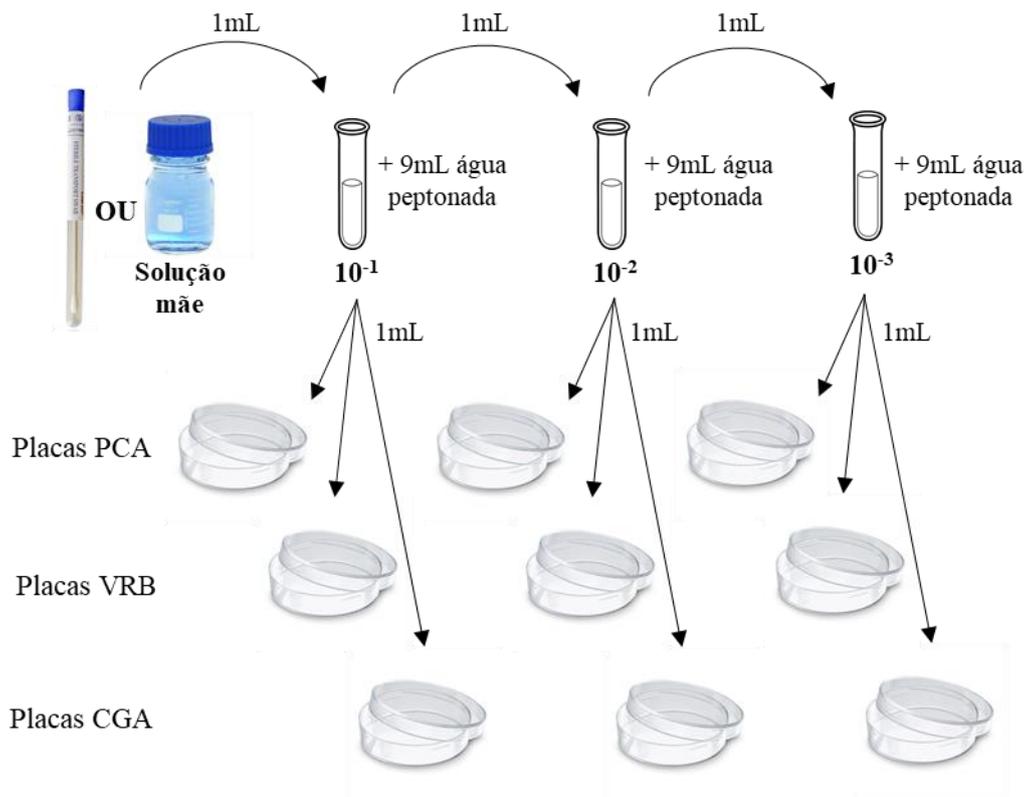


Figura 11 - Diagrama referente às diluições a realizar e sua distribuição pelas diferentes placas de incubação

4.2.3. Análise de produto acabado, cremes, matérias-primas e testes de superfície

Após a realização das diferentes diluições das amostras de produto acabado, cremes, matérias-primas e testes de superfície, estas foram distribuídas pelas respectivas placas de incubação (Figura 11). Para cada amostra foram identificadas 12 placas de petri, para as 3 diluições e para as 4 análises a realizar, ou seja, para os 4 meios de cultura utilizados. Na Tabela 4 encontra-se a informação relativa aos meios de cultura utilizados em cada análise, assim como a temperatura e o tempo de incubação necessários.

Para cada análise, após a incubação das placas, foi feita a contagem dos microrganismos/colónias existentes. No caso específico das enterobactérias, contaram-se as colónias características (rosa-roxo-púrpura sem halo) e de seguida isolaram-se e repicaram-se pelo menos 5 dessas colónias em placa com o meio agar. Após a incubação contaram-se as colónias viáveis.

Tabela 4 – Incubação de placas - meio de cultura, temperatura de incubação e tempo de incubação para cada agente a analisar

Agente	Meio de cultura	Temperatura de incubação	Tempo de incubação
Coliformes	VRB	37°C	2 dias
Contagem Total / Mesófilos	PCA	30°C	3 dias
Bolores e leveduras	CGA	25°C	5 dias
Enterobactérias	VRBG	37°C	24±2h

4.2.4. Análise de águas

a) Análise de contagem total (mesófilos)

Na análise de contagem total das águas foram analisados os microrganismos mesófilos que crescem a 22°C e os microrganismos que crescem a 37°C. Esta análise foi realizada em placa por incorporação, utilizando como meio de cultura o Tryptone Yeast Extract Agar. A incubação foi feita durante 48 horas para as placas a 37°C e durante 72 horas para placas a 22°C.

b) Análise de coliformes e *enterococcus*

Nas análises de coliformes e *enterococcus* as amostras de água foram filtradas utilizando uma rampa de filtração a vácuo. Foram também utilizadas membranas de filtração apropriadas para cada agente de pesquisa e com o meio correspondente. Para a análise de coliformes foi utilizada uma membrana com o meio de Lactose TTC Agar with Tergitol 7 – TTC 0,05%. Para a análise de *enterococcus* foi utilizada uma membrana de filtração Enterococcus Seletive Agar acc to Slanetz and Bartley.

Após a filtração as membranas foram colocadas em placas de *petri* para serem incubadas respeitando as seguintes temperaturas e tempos:

- Coliformes – 37°C durante 24 horas;
- *Enterococcus* – 37°C durante 48 horas.

Após a contagem das colónias existentes, caso existam colónias de coliformes totais de cor roxa escura/bordeaux e com brilho metálico que poderão indicar a existência de coliformes fecais, procedeu-se à sua repicagem.

Repicagem

Para todas as colónias com suspeita de serem coliformes fecais foi realizada primeiramente uma análise de repicagem em placa utilizando o meio de cultura Caso Agar, com uma incubação de 24 horas a 37°C. De seguida foram feitos os testes efetivos de repicagem de uma colónia suspeita. Em primeiro lugar realizou-se o teste Bachident Oxidase para deteção de coliformes fecais como por exemplo *Streptococcus*, *Listeria*, *Staphilococcus*, *Enterobactereacea* e só depois se realizou o teste Bachident Idole para deteção de *E. coli*.

Interpretação dos resultados:

- Rosa acastanhado – positivo
- Amarelo – negativo

4.3. Acompanhamento de Auditoria interna

De acordo com a definição do *Institute of Internal Auditors (IIA)*⁶⁴, uma auditoria interna é uma atividade independente, de avaliação objetiva e de consultoria, que tem como objetivo acrescentar valor e melhorar as operações de uma organização. Ela pretende ajudar a organização na concretização dos seus objetivos através de uma abordagem sistemática e disciplinada, na avaliação da eficácia da gestão do risco, do controlo e dos processos de governação.

A realização do acompanhamento de uma auditoria interna de qualidade e segurança, teve como principais objetivos perceber quais as principais falhas na higienização da linha de produção dos bolos e croissants e detetar possíveis pontos de contaminação do produto.

Ao longo do acompanhamento da auditoria interna na linha de produção dos bolos e croissants foram detetadas algumas não conformidades como a higienização deficiente de alguns equipamentos e superfícies. Deste modo, alguns dos pontos identificados iriam ser analisados quanto ao seu conteúdo em microrganismos deteriorantes (explicado à frente no ponto 3).

4.4. Acompanhamento da linha de produção

A linha de produção dos bolos e croissants divide-se principalmente em duas partes distintas, a produção dos cremes de chocolate e baunilha e a produção em série do produto final em si.

Os principais objetivos do acompanhamento da linha de produção, quer dos cremes, quer do produto final, foram:

- Perceber todo o processo de produção do produto;
- Detetar falhas/pontos fracos na produção;
- Detetar procedimentos menos corretos realizados pelos operadores.

4.5. Análise do plano HACCP da linha de produção

Como o plano HACCP é um sistema que identifica, avalia e controla os perigos e riscos que são significativos e possíveis de ocorrer nos diferentes géneros alimentícios ao longo de toda a cadeia alimentar⁸, a linha de produção dos bolos e croissants apresenta um plano HACCP desde a receção das diferentes matérias-primas até ao armazenamento do produto final. A sua análise teve como principais objetivos perceber quais os principais pontos críticos de controlo (PCC's) da linha de produção e detetar outros que poderiam ser importantes de controlar.

Os principais PCC's da linha de produção prendem-se com o controlo de perigos físicos, através da crivagem de matérias-primas como a farinha, da crivagem do *Dimodan* e dos cremes aquando a sua transferência para os tanques de armazenamento e para as agulhas de injeção do creme. Para além disso, o controlo de perigos físicos é ainda feito através da utilização de detetores de metais. Outro PCC importante é o controlo do doseamento do sorbato de potássio, usado como conservante na produção dos cremes, e do propionato de cálcio, usado na produção da massa, que pretende controlar perigos microbiológicos se a dosagem utilizada for inferior ao pretendido e também perigos químicos se a sua dosagem ultrapassar a dosagem máxima legislada (2kg/1000kg de creme e 3kg/1000kg de massa).

5. Análise comparativa de dados de anos anteriores para estudo de contaminações microbiológicas

Como problema de grande importância na empresa onde foi realizado o estágio curricular, é detetada frequentemente a contaminação microbiológica dos produtos de confeitaria/panificação produzidos. Essa contaminação é caracterizada pelo aparecimento de bolores, principalmente na zona de injeção dos cremes, ou seja, nos pequenos orifícios que se fazem notar após a penetração das agulhas com creme no bolo ou croissant cozido (Figura 12). O número de reclamações devido a bolores, por milhão de bolsas produzidas (cpm) destes produtos é de 2,0.

As contaminações com bolores verificam-se maioritariamente nos bolos cilíndricos recheados com creme de cacau, onde são recebidas várias reclamações, sendo também frequentemente detetadas no estudo de vida útil que é realizado internamente na empresa como controlo do produto para todas as produções. Este facto pode ser justificado a partir das percentagens de produções com ocorrência de contaminação com bolores e das produções com reclamações, em relação ao número de produções totais para cada produto produzido (Figuras 13 e 14). É perceptível que cerca de metade das produções do bolo cilíndrico (50,8%) apresentaram contaminações visíveis em pelo menos uma unidade, bem como 35,6% das mesmas produções totais receberam reclamações. Para os restantes produtos, essas percentagens não são tão significativas. Deste modo, é possível perceber a partir da deteção de contaminação no estudo de vida útil do produto acabado e das reclamações recebidas, que existe uma ocorrência bastante frequente de contaminações do produto acabado, particularmente no bolo cilíndrico. Este facto motiva, portanto, a estudar e perceber quais as causas que levam à contaminação do produto, para se conseguir diminuir ou mesmo eliminar este problema, aumentando assim a sua qualidade.

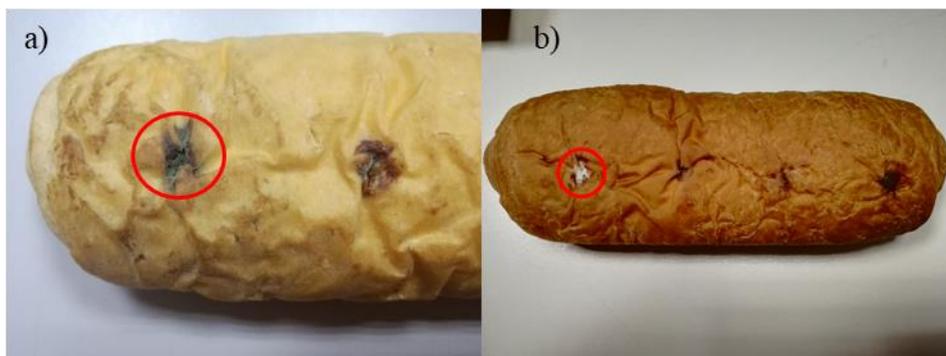


Figura 12 – Representação de dois exemplos de contaminação com bolores na zona de injeção dos bolos cilíndricos

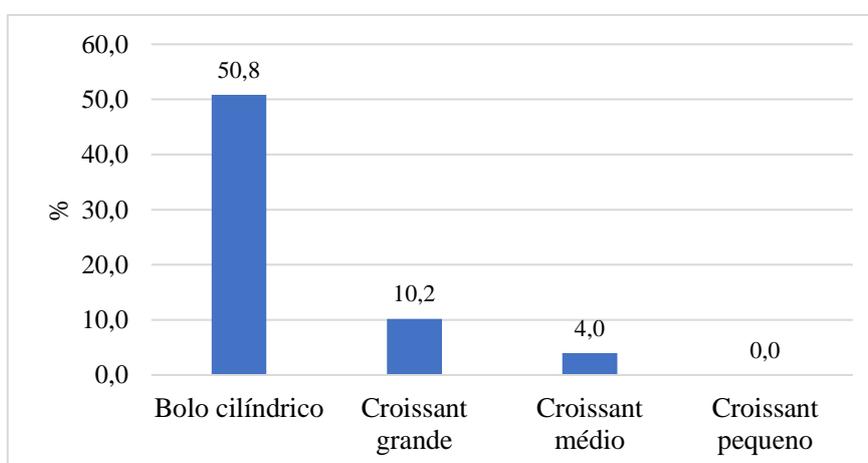


Figura 13 - Percentagem de produções com ocorrência de contaminação com bolores vs total de produções de 2018 e 2019 para cada produto produzido

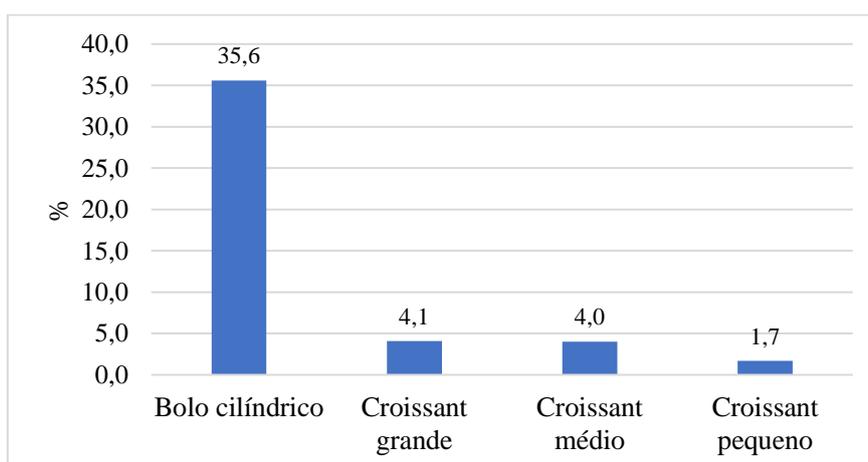


Figura 14 - Percentagem de produções com ocorrência de reclamações vs total de produções de 2018 e 2019 para cada produto produzido

Para avaliar a relevância destes factos e para perceber quais os fatores que mais os vão influenciar, foi realizado um estudo comparativo dos dados de anos anteriores (2018 e 2019), referentes a diversos parâmetros que se considera poderem influenciar a contaminação do produto acabado. Apesar de o bolo cilíndrico ser o produto mais atingido por estas contaminações, foram analisados os dados relativos a todos os produtos que são fabricados, de forma a servirem como pontos de comparação.

Os parâmetros identificados como possíveis influenciadores no desenvolvimento de microrganismos e contaminação do produto acabado são fatores intrínsecos ao produto, como a a_w , o pH e a percentagem de humidade e fatores externos ao produto, como a temperatura a que este se encontra quando é embalado e a composição/contaminação do ar atmosférico do ambiente fabril. Para além disso, destacam-se ainda outros parâmetros, como o correto funcionamento das máquinas de embalar, a correta higienização da linha de produção (equipamentos, utensílios e espaços), bem como a contaminação microbiológica dos cremes utilizados como recheio. Não foi possível avaliar e estudar todos os parâmetros indicados devido à interrupção do estágio causada pelo Plano de Prevenção e Atuação face à pandemia de COVID-19, bem como, para outros parâmetros, seria necessário um estudo alargado que não era possível de ser realizado no tempo disponível. Deste modo, serão apresentados os resultados, quer conclusivos, quer sem conclusões sólidas, dos seguintes parâmetros estudados: máquinas de embalar, higienização da linha de produção, pH, % de humidade, a_w e contaminação microbiológica dos cremes.

5.1. Máquinas de embalar

A linha de produção de croissants e bolos recheados da empresa é composta por várias máquinas de embalar, que embalam em série o produto final nas bolsas específicas para cada tipo de produto. Para além disso, estas são ainda diferenciadas nas máquinas que embalam apenas os croissants pequenos e nas máquinas que embalam os bolos cilíndricos e os croissants grandes e médios. Assim, neste estudo foram apenas consideradas as máquinas que embalam os bolos cilíndricos e os croissants grandes e médios, uma vez que os problemas de contaminação atingem na sua maioria os bolos cilíndricos. Dentro de todas as funções que apresentam, as máquinas de embalar são responsáveis pela selagem das embalagens. Logo, o seu correto funcionamento é de extrema importância para garantir que as embalagens são seladas de forma correta, de maneira a não haver entrada de contaminações e humidade, que poderão levar à deterioração do produto.

Para tentar perceber se o funcionamento das máquinas utilizadas para embalar os bolos cilíndricos poderia ter alguma influência no aparecimento de contaminações, reuniram-se os dados relativos às máquinas que embalaram as amostras que no estudo de vida útil apresentaram contaminação visível com bolores, referentes aos dois anos anteriores. O objetivo era verificar se existia algum tipo de padrão entre as diferentes máquinas quando comparadas com o produto que embalaram, ou seja, se alguma das máquinas de embalar poderia apresentar uma correspondência com um maior número de amostras contaminadas, o que poderia significar que essa máquina estaria com problemas no embalamento (na sua selagem principalmente). Verificou-se que as máquinas correspondentes a um maior número de amostras contaminadas eram a 64 e 65 (Figura 15), o que induzia a que estas poderiam não estar a funcionar corretamente e este ser um fator de contaminação do produto. Contudo, este facto não foi esclarecedor, pois ao mesmo tempo verificou-se que as recolhas de todas as amostras utilizadas nas análises do estudo de vida útil não eram uniformes. Através do número médio de recolhas anuais (de 2018 e 2019) por máquina de embalar (Figura 16), verificou-se que existia uma maior tendência para a recolha de produto das máquinas 64 e 65 em contraste com as máquinas 66 e 67, diferença que era bastante significativa. As amostras utilizadas para as análises microbiológicas do estudo de vida útil são recolhidas pelos analistas ao longo de todas as produções. As máquinas 64 e 65 são as que se encontram mais próximas da passagem

para o laboratório onde são guardadas. Assim, os analistas poderão ter a tendência de fazer as recolhas nas máquinas mais próximas, o que pode justificar o maior número de amostras recolhidas destas duas máquinas. Posto isto, devido a esta tão elevada discrepância entre as recolhas das diferentes máquinas, não é possível retirar qualquer conclusão acerca da influência do funcionamento das máquinas de embalar no aparecimento de contaminações no produto acabado. Para se conseguir chegar a alguma conclusão, seria importante realizar um estudo mais específico e equilibrado focado no funcionamento de cada máquina de embalar, ou seja, no seu correto embalamento.

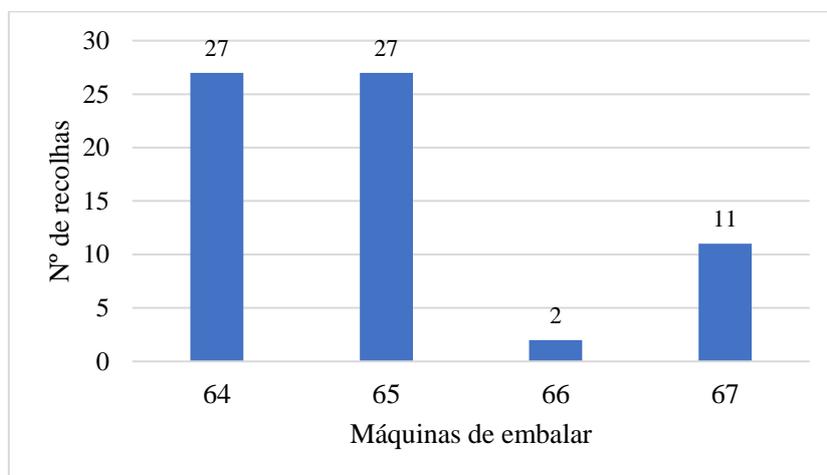


Figura 15 - Número de recolhas por máquina de embalar correspondentes a amostras que apresentaram contaminação visível com bolores ao longo dos anos 2018 e 2019

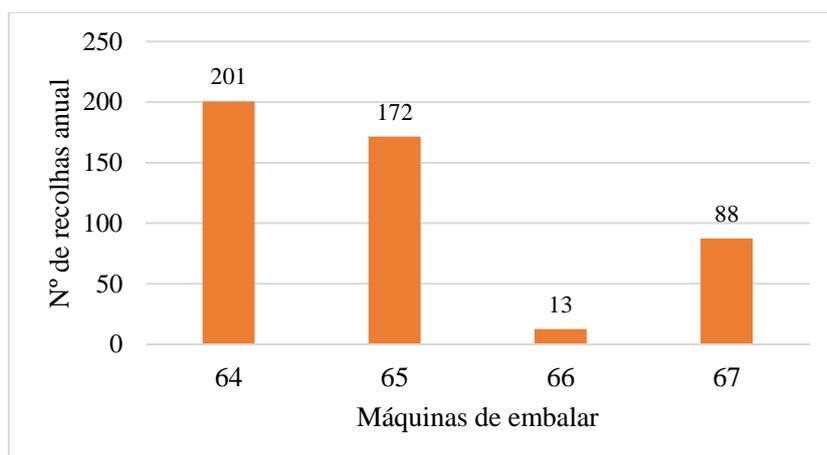


Figura 16 – Número médio de recolhas anual por máquina de embalar de todas as amostras recolhidas nos anos 2018 e 2019 utilizadas no estudo de vida útil

5.2. Higienização da linha

Como o ar ambiente das indústrias alimentares é considerado um importante disseminador de esporos de fungos, ou seja, é uma fonte importante de contaminação, a correta higienização do ambiente fabril, ar, utensílios e equipamentos de produção e o seu elevado controlo são fatores extremamente importantes para reduzir e evitar a contaminação dos produtos alimentares. Por esta razão, este parâmetro foi considerado importante na influência do aparecimento de bolores nos bolos e croissants, tendo sido analisado neste estudo.

Começou-se por avaliar se existia alguma correlação entre o número de dias que a linha de produção ficava por higienizar e as produções em que houve aparecimento de contaminação no produto acabado. O objetivo foi perceber se a linha, ao ficar alguns dias sem limpeza e higienização, poderia levar ao desenvolvimento de microrganismos nas superfícies que posteriormente seriam mais difíceis de remover e, portanto, iriam contaminar o produto ao longo da sua produção. Esta análise foi realizada através dos registos de higienização feitos pelos operadores, onde são indicados os dias em que cada parte e elemento da linha de produção são higienizados, mais propriamente as zonas de laminagem, injeção e embalamento.

Pelos registos disponíveis e que foram analisados e comparados com as produções onde houve aparecimento de bolores, não foi possível concluir que este facto vá de alguma forma influenciar a contaminação. Primeiro, encontrava-se em falta um elevado número de registos semanais, o que não permitiu avaliar todas as semanas de produção e comparar com todas as produções com ocorrência de contaminação. Para além disso, das comparações que foram possíveis de realizar, verifica-se que não há diferenças significativas entre as percentagens referentes aos diferentes números de dias sem limpeza de cada zona da linha de produção (Figura 17).

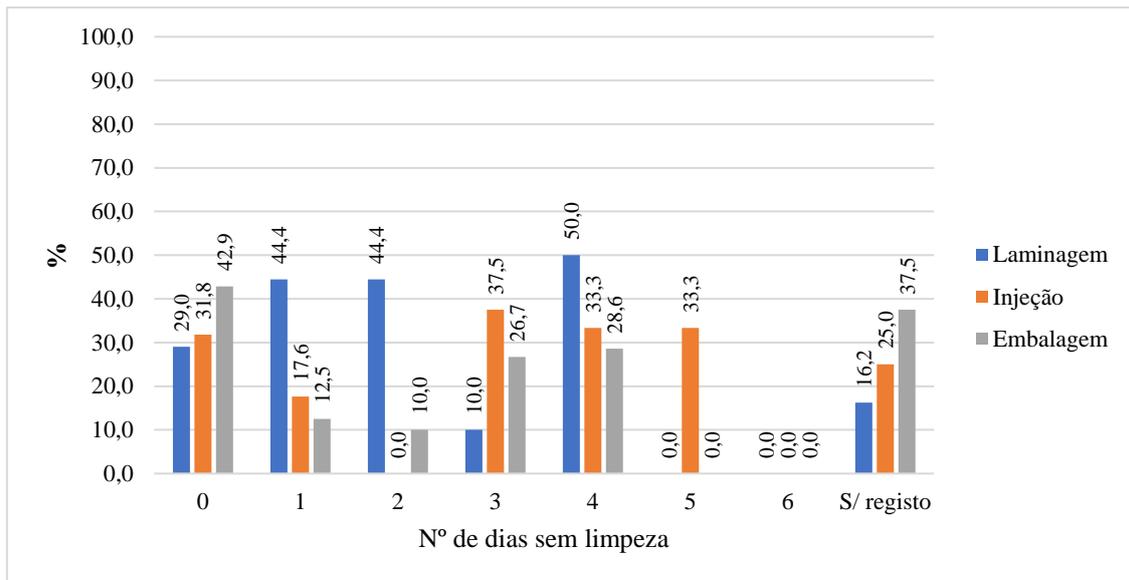


Figura 17 - Percentagens de produções em que se verificaram contaminações vs número de semanas correspondentes aos dias em que cada zona da linha de produção (laminagem, injeção e embalagem) se manteve sem limpeza

5.3. pH do produto acabado

Na Tabela 5 são apresentados os valores de pH referentes a 2018 e 2019 para os bolos e croissants e respetiva gama ótima. A empresa estabeleceu uma gama ótima (verde), uma gama aceitável (amarelo) e uma gama de rejeição (vermelho) para os valores de pH do produto, apresentando cada tipo de produto gamas específicas. As gamas ótimas, consideradas as mais relevantes para este estudo, variam entre o valor mínimo de pH de 5,5 e o valor máximo de 5,8. Em média, quer os valores de pH relativos ao bolo cilíndrico, quer os valores de pH dos restantes produtos, se encontram todos dentro das suas gamas ótimas de pH estipuladas pela empresa. Para além disso, apesar de as médias de cada produção relativas ao bolo cilíndrico apresentarem algumas oscilações (Figura 18), não parece haver diferença entre as médias das produções onde houve contaminação com bolores das produções sem contaminação, ou seja, as oscilações ocorrem de forma aleatória e a maioria encontra-se na sua gama ótima. Desta forma, não é possível concluir se o pH ou as suas oscilações apresentam alguma causa no aparecimento de bolores no produto acabado.

Tabela 5 – Valores de pH referentes a 2018 e 2019 para o bolo cilíndrico e croissants e respetiva gama ótima

	Média	Desvio Padrão	Gama ótima
Bolo cilíndrico	5,5	± 0,06	5,5 - 5,7
Croissant grande de baunilha	5,7	± 0,07	5,6 - 5,8
Croissant grande de chocolate	5,5	± 0,04	5,5 - 5,7
Croissant médio	5,5	± 0,07	5,5 - 5,7
Croissant pequeno de baunilha	5,7	± 0,07	5,6 - 5,8
Croissant pequeno de chocolate	5,5	± 0,06	5,5 - 5,7

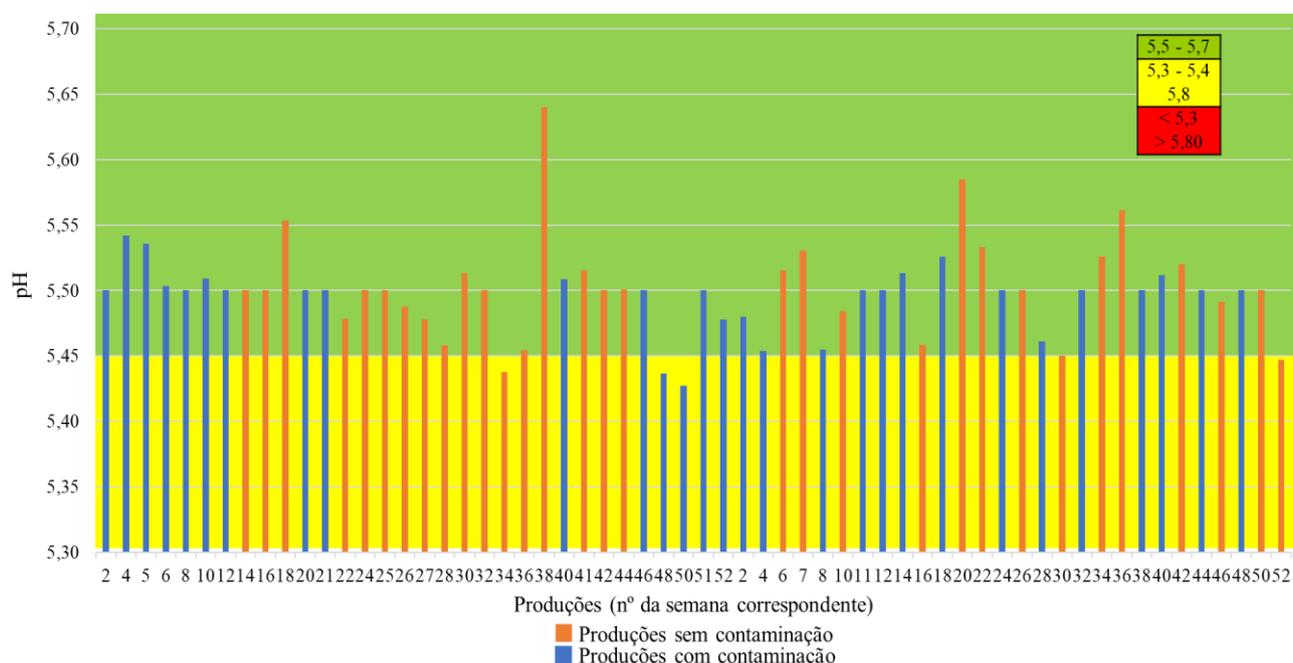


Figura 18 - Médias dos valores de pH de cada produção de bolo cilíndrico, com distinção das produções com e sem contaminação.

A realização da análise ao pH dos produtos acabados não é suficiente para se retirarem conclusões de que este parâmetro pode estar a influenciar o aparecimento de bolores no produto acabado. Para além disso, não é possível também saber se as gamas ótimas estipuladas pela empresa são propícias ao desenvolvimento dos microrganismos em questão. Sabe-se que os bolores apresentam uma gama bastante extensa de pH a que se conseguem desenvolver e, por isso, os valores ótimos a que os produtos são produzidos, apesar de ácidos e em conjugação com outras características e com o uso de conservantes, podem ser propícios ao seu crescimento. Deste modo, só se conseguiria justificar esta

hipótese se fosse realizado um estudo de vida útil com variações nos valores de pH do produto.

5.4. % de humidade do produto acabado

A % de humidade dos alimentos é considerada a percentagem total de água neles existente, quer a água livre, quer a água ligada, e é importante para a garantia da sua qualidade e estabilidade. Foram, por esta razão, também analisados os dados existentes para a humidade relativa do produto acabado, referentes aos dois anos anteriores.

Tal como para o pH, também para a % de humidade cada tipo de produto apresenta uma gama ótima específica, que variam entre o valor mínimo de humidade de 17,0% e o valor máximo de 22,0% (Tabela 6). Após o cálculo das médias de todos os valores de humidade de 2018 e 2019 relativos a todos os produtos fabricados, verificou-se que apenas o croissant grande, quer com recheio de baunilha, quer com recheio de chocolate, apresenta valores relativamente acima da gama ótima. Estes valores indicam que o produto pode apresentar na maioria das suas produções uma % de humidade mais elevada do que o pretendido e que isto poderia levar a um aumento da probabilidade de crescimento de microrganismos. Contudo, este produto não é aquele que apresenta mais problemas de contaminação; mesmo sendo o segundo a apresentar mais contaminação, como visto na secção 5., esses valores não parecem ser relevantes. Assim, o bolo cilíndrico, ao ser o produto que efetivamente apresenta os maiores problemas e o seu valor médio de humidade não se encontrar fora da gama ótima, não é possível perceber se este parâmetro está a influenciar de alguma forma o desenvolvimento de bolores. Para além disso, tal como para o caso do pH, também para a % de humidade se verifica que as médias de cada produção relativas ao bolo cilíndrico apresentam algumas oscilações (Figura 19), mas que estas ocorrem de uma forma aleatória, não se observando uma diferença de humidades entre as produções com contaminação e as produções sem contaminação. Também a maioria das médias das produções encontra-se dentro da sua gama ótima de humidade. Deste modo, não é possível chegar a uma conclusão apenas com a comparação entre os valores médios da % de humidade de cada produção.

Tabela 6 - % de humidade referente a 2018 e 2019 para o bolo cilíndrico e croissants e respetiva gama ótima

	Média (%)	Desvio Padrão	Gama ótima
Bolo cilíndrico	20,9	± 0,82	19,6 - 21,6
Croissant grande de baunilha	21,4	± 1,02	18,5 - 21,0
Croissant grande de chocolate	21,2	± 0,94	18,5 - 21,0
Croissant médio	20,8	± 1,07	19,0 - 22,0
Croissant pequeno de baunilha	17,9	± 0,83	17,0 - 19,0
Croissant pequeno de chocolate	18,1	± 0,86	17,0 - 19,0

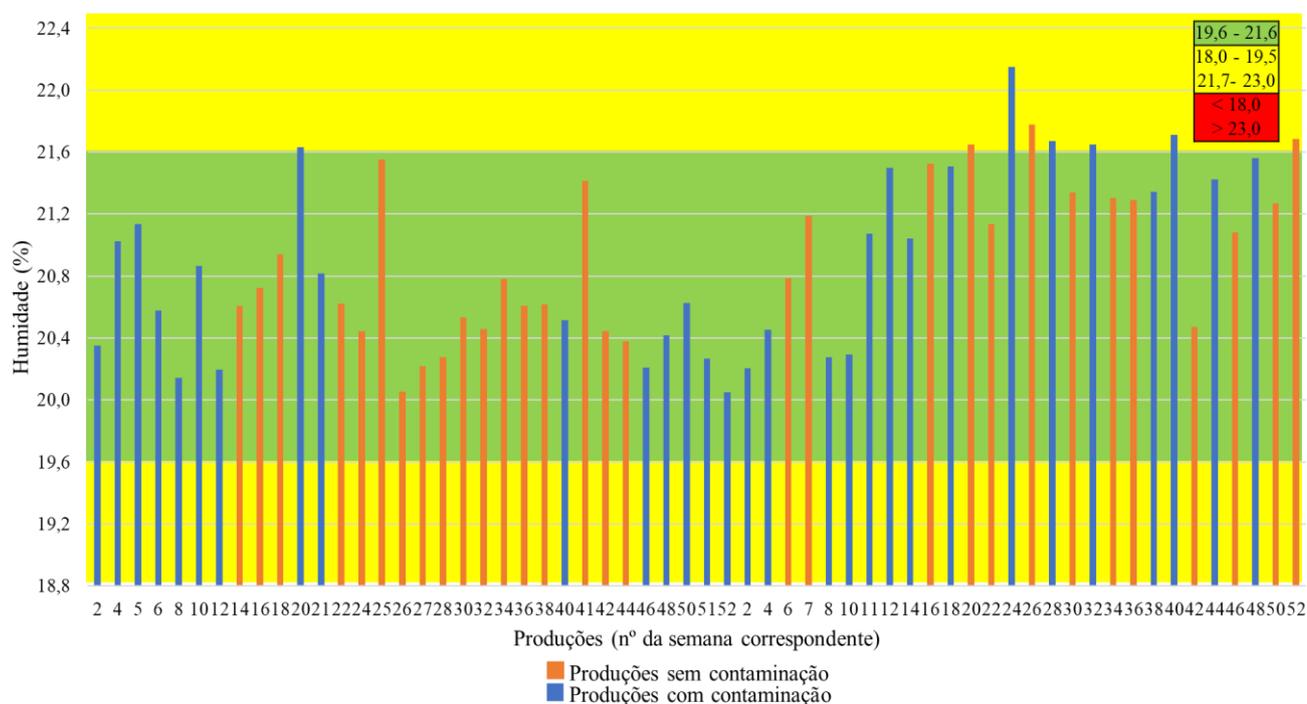


Figura 19 - Médias dos valores de humidade de cada produção de bolo cilíndrico, com distinção das produções com e sem contaminação.

Relativamente aos valores ótimos que são pretendidos para o produto final, estes são efetivamente baixos, ou seja, o produto acabado tem a característica de, no geral, apresentar uma % de humidade baixa. Contudo, sendo a humidade composta pela água livre e água ligada, é possível que, mesmo com uma quantidade de água total baixa, a percentagem de água disponível para uso pelos microrganismos seja elevada e permita o seu desenvolvimento. Deste modo, foram também analisados os dados existentes

relativos à a_w do produto acabado, que foi considerado um parâmetro mais crítico no que toca ao crescimento de microrganismos.

5.5. Atividade da água do produto acabado

A média calculada para todos os valores de a_w de 2018 e 2019 relativos a todos os produtos fabricados encontra-se na Tabela 7. Verificou-se que todos os tipos de croissants apresentam um valor médio de a_w dentro da sua gama ótima, o que vai ao encontro do facto destes produtos não apresentarem contaminações significativas ou que são mesmo escassas. Por esta razão, e mesmo apesar dos valores de a_w em si serem relativamente elevados para o crescimento de microrganismos, ao permanecerem na gama ótima estipulada pela empresa poderá ajudar na redução de contaminações microbiológicas nestes produtos.

Tabela 7 – Valores de atividade da água referentes a 2018 e 2019 para o bolo cilíndrico e croissants e respetiva gama ótima

		Média	Desvio Padrão	Gama ótima
Bolo cilíndrico	Global	0,865	0,011	0,76 - 0,860
	Sem bolores	0,864	0,011	
	Com bolores	0,866	0,011	
	Reclamações	0,866	0,010	
Croissant grande de baunilha		0,874	0,011	0,770 - 0,880
Croissant grande de chocolate		0,870	0,012	0,770 - 0,880
Croissant médio		0,861	0,008	0,810 - 0,880
Croissant pequeno de baunilha		0,843	0,012	0,750-0,855
Croissant pequeno de chocolate		0,834	0,013	0,750-0,855

Para o produto que apresenta mais problemas de contaminação, os bolos cilíndricos, o valor médio global obtido encontra-se relativamente fora da sua gama ótima (Tabela 7), o que poderá indicar que as contaminações microbiológicas podem estar mais suscetíveis de ocorrer neste tipo de produto devido em parte à a_w superior à gama ótima. Este resultado levou a efetuar as médias relativas aos valores de a_w do bolo cilíndrico coincidentes com produções sem contaminação, produções com contaminação e produções onde houve reclamações por parte de consumidores devido ao aparecimento de bolores. Os três valores médios obtidos também se encontram fora da gama ótima (Tabela 7), mesmo o correspondente às produções sem contaminação. Contudo, pela

Figura 20 é possível verificar que as médias para a a_w relativas às produções com contaminação e às produções com reclamações são relativamente superiores à média correspondente às produções sem contaminação. Assim sendo, este facto pode indicar que efetivamente o aparecimento de bolores nos bolos cilíndricos vai ser bastante influenciado pela a_w que estes apresentam. Apesar da média da a_w para as produções sem contaminação se apresentar fora da gama ótima, valores superiores vão levar a um aumento da probabilidade de desenvolvimento de microrganismos. Deste modo, será bastante importante para a possível redução de contaminações, o controlo rígido deste parâmetro ao longo das produções deste produto.

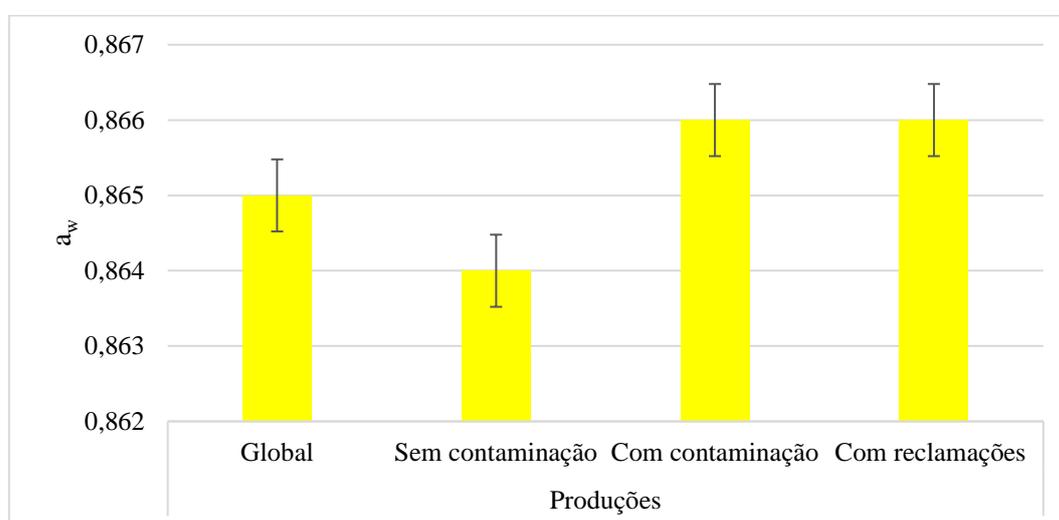


Figura 20 – Médias dos valores de a_w correspondentes às produções globais, produções sem contaminação, produções com contaminação e produções com reclamações dos bolos cilíndricos

Outro aspeto que suscitou interesse foi a a_w dos cremes poder ser superior à a_w do produto intermédio, ou seja, do produto sem recheio, por levar ao aumento em grande escala da a_w do produto acabado, o que aumentaria a probabilidade de crescimento de microrganismos. Para tentar perceber se efetivamente a a_w dos cremes pode ter influência, teria de se proceder a um estudo acerca da a_w do produto intermédio, produto acabado e cremes. Estas medições não foram possíveis de realizar devido à interrupção do estágio por motivos da Pandemia de COVID-19 e por isso foi um dos trabalhos que ficou por realizar.

Após a realização das médias da a_w por produção, relativas às produções dos bolos cilíndricos, verificou-se que não existem diferenças visíveis entre as produções com e

sem aparecimento de contaminações com bolores (Figura 21). As oscilações que são verificadas ocorrem de forma aleatória. Um grande número de produções de bolo cilíndrico não apresenta valores de a_w , devido ao equipamento de medição se ter encontrado em manutenção durante um longo período de tempo. Contudo, na maioria das produções com e sem contaminação foi possível avaliar a a_w , encontrando-se as médias fora da gama ótima, ou seja, mais elevadas do que o pretendido. Deste modo, é possível concluir que mesmo que a a_w do produto acabado tenha uma elevada influência no crescimento de bolores, devido às oscilações deste parâmetro serem aleatórias, outros parâmetros poderão também estar na base da contaminação dos bolos cilíndricos.

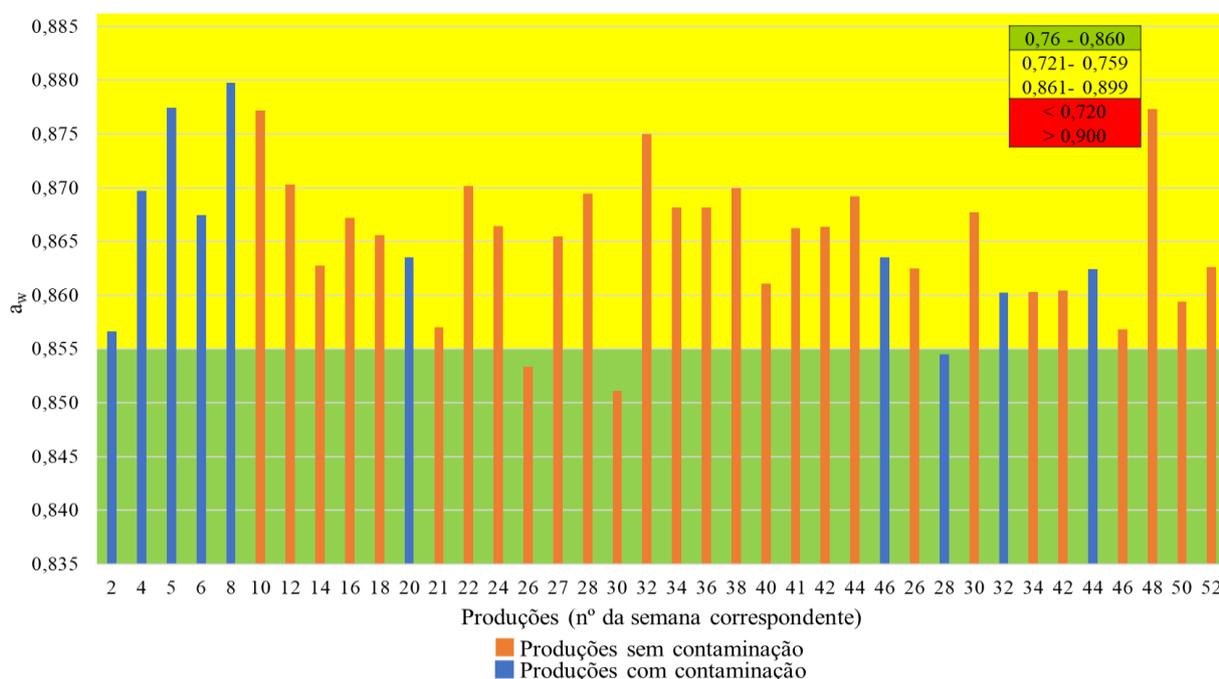


Figura 21 - Médias dos valores de a_w de cada produção de bolo cilíndrico, com distinção das produções com e sem contaminação

5.6. Carga microbológica dos cremes

Os cremes utilizados como recheio para os diferentes produtos são controlados microbiologicamente, sendo recolhidos para análise imediatamente antes de serem injetados nos bolos e croissants. Posteriormente e num prazo de dois dias são analisados quanto ao conteúdo em coliformes, mesófilos (contagem total), bolores, leveduras e enterobactérias. Deste modo, foram estudados os resultados obtidos para as análises de

contagem total (mesófilos) e de bolores dos diferentes cremes analisados ao longo dos anos de 2018 e 2019, para perceber se apresentavam contaminações significativas que pudessem vir a comprometer a segurança dos bolos.

A Figura 22 mostra as percentagens totais de cremes que apresentavam carga microbiológica no que toca à análise de contagem total (mesófilos) e de bolores em amostras recolhidas dos tanques de armazenamento e amostras recolhidas a partir das agulhas de injeção do creme. As percentagens de cremes com valores de contaminação na gama considerada ótima (verde) e na gama considerada aceitável (gama amarela) são apresentadas na Figura 23. Verificou-se que 79,5% dos cremes dos tanques de armazenamento e 88,9% dos das agulhas de injeção apresentam carga microbiológica no que toca à análise de Contagem Total (mesófilos). Já as análises aos bolores apresentam percentagens bastante reduzidas de contaminação dos cremes. Dos 79,5% de cremes dos tanques com carga microbiológica, aproximadamente metade (52,9%) apresentam valores de contaminação na gama ótima e outra metade (47,1%) na gama aceitável (Figura 23). Para os 88,9% dos cremes das agulhas com carga microbiológica, 34,9% apresentam valores de contaminação na gama ótima e 65,1% na gama aceitável. Estes resultados mostram que a maioria dos cremes analisados e utilizados na produção dos bolos e croissants nos anos 2018 e 2019 apresentavam contaminação microbiológica e que aproximadamente metade dos cremes apresentou esses valores de contaminação fora da gama considerada ótima. Apesar de muitos dos cremes apresentarem valores de contagem total na gama ótima, ao apresentarem carga microbiológica, podem levar ao aparecimento de contaminação a longo prazo nos produtos. Deste modo, é possível concluir que a carga microbiológica dos cremes utilizados como recheio é alta, o que poderá ser considerada uma possível fonte de contaminação dos bolos e croissants.

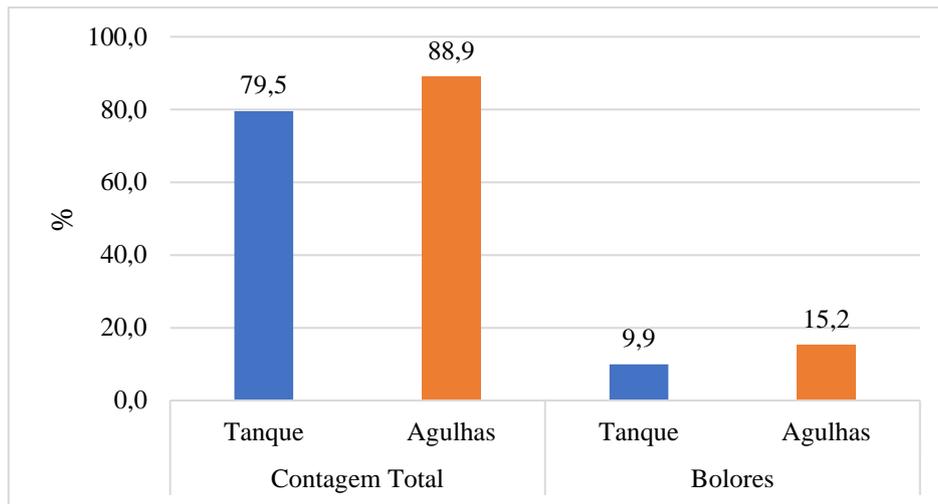


Figura 22 – Percentagens totais de cremes, recolhidos dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção, que apresentaram carga microbiológica nas análises de Contagem Total e de Bolores nos anos de 2018 e 2019

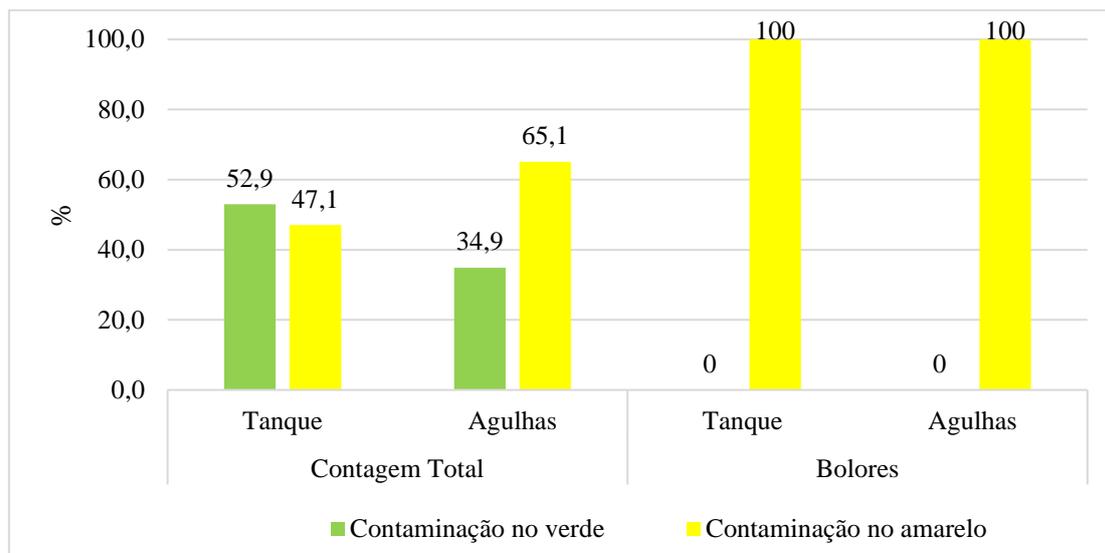


Figura 23 – Percentagens totais de cremes, recolhidos dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção, que apresentaram carga microbiológica na gama ótima (verde) e na gama aceitável (amarelo), referentes às análises de Contagem Total e de Bolores nos anos de 2018 e 2019

O cálculo das médias dos valores obtidos nas análises microbiológicas referentes à contagem total das amostras dos tanques e das agulhas, dos cremes de chocolate (Tabela 8) utilizados em todas as produções em 2018 e 2019 permite verificar que o valor médio global do creme de chocolate se encontra fora da sua gama ótima para a análise de contagem total. Estes resultados devem-se ao facto de uma grande percentagem dos cremes utilizados nas produções terem apresentado valores na gama do amarelo

(aceitável), ou seja, a sua carga microbiológica é na maioria das vezes elevada, o que pode ser um fator a favor da contaminação dos produtos. Deste modo, sendo os bolos cilíndricos os mais afetados pela contaminação, foram também calculadas as médias referentes a estes produtos, para as análises de contagem total, para as diferentes amostras (tanques e agulhas) e diferenciando ainda pelos cremes utilizados nas produções sem contaminação e nas com contaminação (Tabela 8). Para estes produtos, a média global segue a linha verificada na média global do creme de chocolate. Também as médias referentes às produções com contaminação se encontram fora da gama ótima, podendo este ser um ponto de contaminação. Contudo, também as médias referentes às produções sem contaminação se apresentam fora da sua gama ótima, ou seja, a carga microbiológica está mais elevada do que o pretendido. Todavia, a partir do gráfico representado na Figura 24 verifica-se que as médias das análises de contagem total referentes às produções com contaminação se encontram relativamente mais elevadas do que as médias referentes às produções sem contaminação, quer para as amostras retiradas dos tanques, quer para as das agulhas. Este facto pode provar que a carga microbiológica existente nos cremes pode favorecer o aparecimento de contaminação nos bolos cilíndricos, principalmente se essa carga tiver a tendência para ser mais elevada.

Tabela 8 – Contagem Total (mesófilos) referente às amostras dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção dos cremes de chocolate utilizados em todas as produções e na produção dos bolos cilíndricos

		Contagem Total (UFC/g)	
		Tanque	Agulhas
Global		2,0E+02	6,4E+02
Bolo cilíndrico	Global	2,2E+02	6,4E+02
	Produções sem contaminação	1,7E+02	5,0E+02
	Produções com contaminação	2,6E+02	6,0E+02

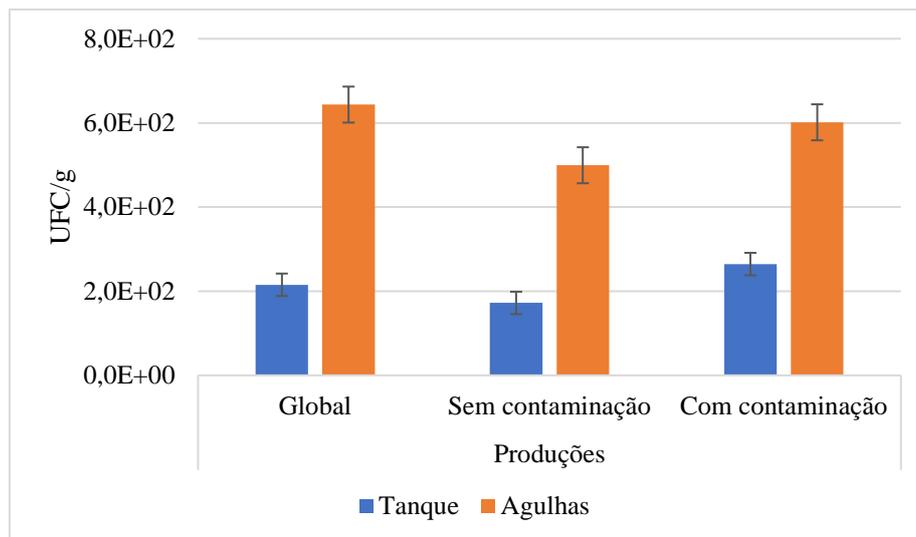


Figura 24 – Contagem Total (mesófilos) referente às amostras dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção dos cremes de chocolate utilizados na produção dos bolos cilíndricos

Ao contrário do que se verificou anteriormente para as análises de contagem total, as médias relativas ao conteúdo em bolores nos tanques de armazenamento dos cremes de chocolate encontram-se dentro da sua gama ótima, quer para os cremes de chocolate globalmente, quer para os cremes utilizados especificamente no recheio dos bolos cilíndricos (Tabela 9). Contudo, o conteúdo em bolores não é nulo em nenhum dos casos, ou seja, existe alguma carga microbiológica no que toca aos bolores. Para as amostras recolhidas das agulhas de injeção, o valor médio encontra-se fora da sua gama ótima. Para além disso, através da Figura 25 é possível verificar que as médias referentes às produções com contaminação são superiores às médias das produções sem contaminação. Deste modo, estes resultados vão ao encontro da hipótese estabelecida de que os cremes utilizados como recheio poderão ser um dos pontos de contaminação dos bolos cilíndricos.

Tabela 9 – Bolores referentes às amostras dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção dos cremes de chocolate utilizados em todas as produções e na produção dos bolos cilíndricos

		Bolores (UFC/g)	
		Tanque	Agulhas
Global		8,7E+00	1,3E+01
Bolo cilíndrico	Global	8,5E+00	1,7E+01
	Produções sem contaminação	4,4E+00	1,1E+01
	Produções com contaminação	8,5E+00	2,5E+01

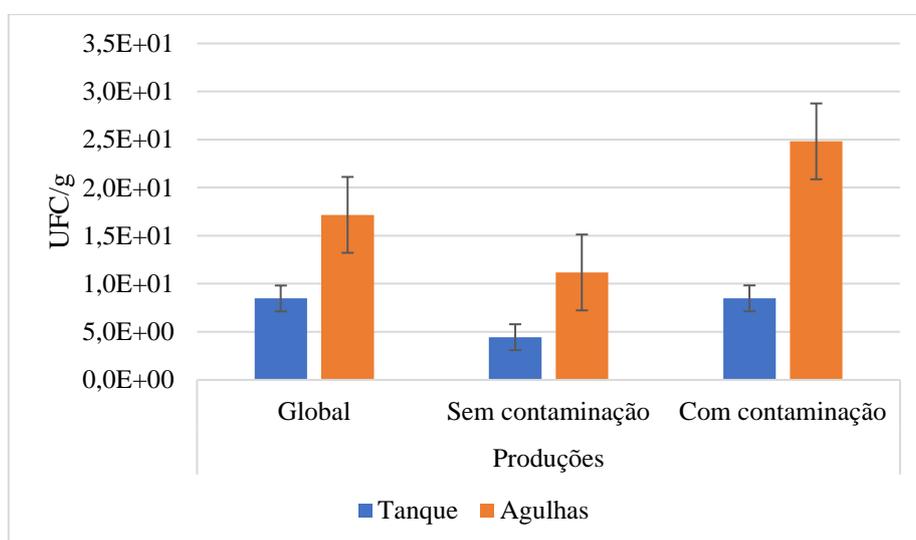


Figura 25 – Bolores referentes às amostras dos tanques de armazenamento e das agulhas de injeção dos cremes de chocolate utilizados na produção dos bolos cilíndricos

As análises realizadas aos cremes de chocolate utilizados como recheio nos bolos cilíndricos mostram que a carga microbológica que estes cremes possuem pode ser um ponto de contaminação dos bolos. Assim, é de enorme importância perceber o porquê de os cremes apresentarem tão elevada carga microbológica e identificar medidas e arranjar procedimentos para a reduzir ou mesmo eliminar.

Os resultados relativos às amostras retiradas das agulhas de injeção, quer nas análises de contagem total (Figura 24), quer nas análises ao conteúdo em bolors (Figura 25), foram sempre significativamente superiores aos respetivos resultados relativos às amostras dos tanques de armazenamento. Esta evidência leva a crer que as próprias

agulhas poderão ser um ponto de concentração de microrganismos que vão ser transferidos para os produtos após a injeção do creme nos bolos e, assim, justificar o aparecimento de bolores maioritariamente nos seus orifícios de injeção. Esta contaminação das agulhas pode dever-se à sua deficiente higienização após cada produção, muito possivelmente devido à sua forma e ao mecanismo de limpeza.

6. Trabalho que ficou por realizar e estudos futuros

Devido à pandemia de COVID-19 que surgiu em março, o estágio curricular foi interrompido e, por essa razão, alguns dos trabalhos que estavam previstos realizar entre março e maio ficaram pendentes. O objetivo principal seria realizar um extenso estudo de análises microbiológicas a superfícies, utensílios e ao ar ambiente. Para além disso, outro estudo que ficou por realizar passava por analisar a atividade da água do produto nas suas diferentes fases de produção.

6.1. Análises microbiológicas

A realização de análises microbiológicas a superfícies, utensílios e ao ar ambiente de toda a linha de produção tinha como principal objetivo confirmar alguns pontos suspeitos de contaminação, bem como perceber se outros poderiam ser considerados como tal e verificar a sua correta higienização. A análise ao ar ambiente iria permitir perceber se a ventilação existente ao longo de toda a linha de produção se encontrava em bom funcionamento e se também poderia ser uma forma de contaminação dos produtos.

Alguns dos pontos que iriam ser analisados foram detetados como não estando em conformidade após feita uma auditoria interna, bem como detetados durante o acompanhamento da linha de produção realizado. Na Tabela 10 encontra-se o mapa de todas as análises microbiológicas que foram planeadas realizar ao longo da linha de produção dos bolos e croissants. Na planificação são indicados quais os pontos a analisar, o tipo de análise em cada ponto e qual a análise a realizar, ou seja, quais os microrganismos a detetar, bem como qual a amostragem e em que altura realizar a sua recolha. A última coluna seria para colocar o dia e a hora previstos para realizar as recolhas das amostras consoante o planeado. Na Figura 26 encontra-se a planta da linha de produção com a indicação da localização de todos os pontos de amostragem para a realização da análise ao ar ambiente.

Todas as análises iriam ser realizadas conforme os procedimentos utilizados no controlo microbiológico dos produtos. Apenas as análises feitas ao ar ambiente diferem em parte no procedimento que tem de ser realizado. As placas de ar utilizadas são primeiramente cheias com o meio de cultura correspondente para cada análise e

posteriormente são colocadas abertas nos locais específicos durante um tempo de exposição de 20 minutos. São de seguida incubadas da mesma forma que as restantes placas para cada análise e lidas de igual forma. Após a leitura das placas e a interpretação dos resultados obtidos em todas as análises microbiológicas, ir-se-ia, se necessário, proceder à realização de um plano de ações corretivas a fim de reduzir e mesmo eliminar contaminações da linha de produção.

Tabela 10 – Planificação das análises microbiológicas a realizar ao longo da linha de produção dos bolos e croissants

Análise	Pontos a analisar	Tipo de análise	Análise a realizar	Amostragem	Altura da recolha	Dia
Câmara das madres	Ar ambiente (câmara das madres M e câmara das madres L e P)	Placas de ar	- Contagem Total - Bolors	- 1 placa por prateleira por análise - Placas colocadas em “zig-zag” - 3 placas por estante por análise - 3 estantes (M, L e P) - Total de amostras: 18 placas	- Em qualquer altura	
	Panos em utilização	Teste de superfície (zaragatoas)	Bolors	- 1 zaragatoa por pano - 3 panos por madre - Total de amostras: 9 zaragatoas; 9 placas	- Em qualquer altura	
	Panos lavados	Teste de superfície (zaragatoas)	- Contagem Total - Bolors	- 1 zaragatoa por pano - 3 panos - Total de amostras: 3 zaragatoas; 6 placas	- Em qualquer altura	
	Recipientes	Teste de superfície (zaragatoas)	- Contagem Total - Coliformes - Bolors e leveduras	- 1 zaragatoa por recipiente - 3 recipientes - Total de amostras: 3 zaragatoas; 9 placas	- Em qualquer altura	
	Massas (M, L, P)	- Preparação de amostra - Teste de superfície (zaragatoas)	Bolors	- 1 amostra de cada madre - 1 zaragatoa por madre - Total de amostras: 3 zaragatoas; 3 placas	- Em qualquer altura	
Tabuleiros de transporte do produto	Tabuleiros sujos (bolo cilíndrico)	Teste de superfície (zaragatoas)	- Contagem Total - Coliformes - Bolors e leveduras	- 3 tabuleiros - 1 zaragatoa por tabuleiro - Total de amostras: 3 zaragatoas; 9 placas - Se for para os croissants pequenos e grandes também: 9 zaragatoas; 27 placas	- <i>Depende do plano de produção</i> - Antes de iniciar a produção	
	Tabuleiros lavados (bolo cilíndrico)	Teste de superfície (zaragatoas)	- Contagem Total - Coliformes - Bolors e leveduras	- 3 tabuleiros - 1 zaragatoa por tabuleiro - Total de amostras: 3 zaragatoas; 9 placas - Se for para os croissants pequenos e grandes também: 9 zaragatoas; 27 placas	- <i>Depende do plano de produção</i> - Após lavagem (mesmos tabuleiros)	
	Água de lavagem	Amostra de água	- Contagem Total (a 22°C e a 37°C) - Coliformes e <i>enterococcus</i>	- Água recolhida do interior da máquina - 2 placas para Contagem Total - 1 placa para Coliformes - 1 placa para <i>enterococcus</i>	- <i>Depende do plano de produção</i> - Durante lavagem de tabuleiros	

Aguilhas de injeção	Exterior das agulhas (croissants pequenos, grandes e bolo cilíndrico)	Teste de superfície (zaragatoas)	- Contagem Total - Coliformes - Bolores e leveduras	- 3 zaragatoas por módulo - 3 módulos - Total de amostras: 9 zaragatoas; 27 placas	- Em qualquer altura (agulhas higienizadas)
	Interior das agulhas (croissants pequenos, grandes e bolo cilíndrico)	Amostras de água peptonada passada pelo interior das agulhas	Bolores	- 3 agulhas por módulo - 10 mL por agulha - Total de amostras: 9 amostras de água; 9 placas	- Em qualquer altura (agulhas higienizadas)
	Máquina lavar agulhas	Teste de superfície (zaragatoas)	- Contagem Total - Coliformes - Bolores e leveduras	- 3 zaragatoas - 9 placas	- Em qualquer altura
	Água de lavagem	Amostra de água	- Contagem Total (a 22°C e a 37°C) - Coliformes e <i>enterococcus</i>	- 2 placas para Contagem Total - 1 placa para Coliformes - 1 placa para <i>enterococcus</i>	- Durante lavagem de agulhas <i>- Depende do plano de produção</i>
Filmes	Filme de bolo cilíndrico	Teste de superfície (zaragatoas)	Bolores	- 1 zaragatoas por filme	- Em qualquer altura
	Filme de bolo cilíndrico para multipack	Teste de superfície (zaragatoas)	Bolores	- 1 zaragatoas por filme	- Em qualquer altura
	Filme dos croissants pequenos	Teste de superfície (zaragatoas)	Bolores	- 1 zaragatoas por filme	- Em qualquer altura
	Filme dos croissants grandes	Teste de superfície (zaragatoas)	Bolores	- 1 zaragatoas por filme	- Em qualquer altura
Ar ambiente	21 pontos específicos ao longo da linha de produção (figura 26)	Placas de ar	- Contagem Total - Bolores	- 2 placas por ponto - Total de amostras: 42 placas por ensaio <i>- Ter em atenção os locais onde se colocam as placas para não ocorrerem contaminações indesejadas com produto.</i>	-Linha parada – em qualquer altura -Linha em produção (bolo cilíndrico) – <i>depende do plano</i>

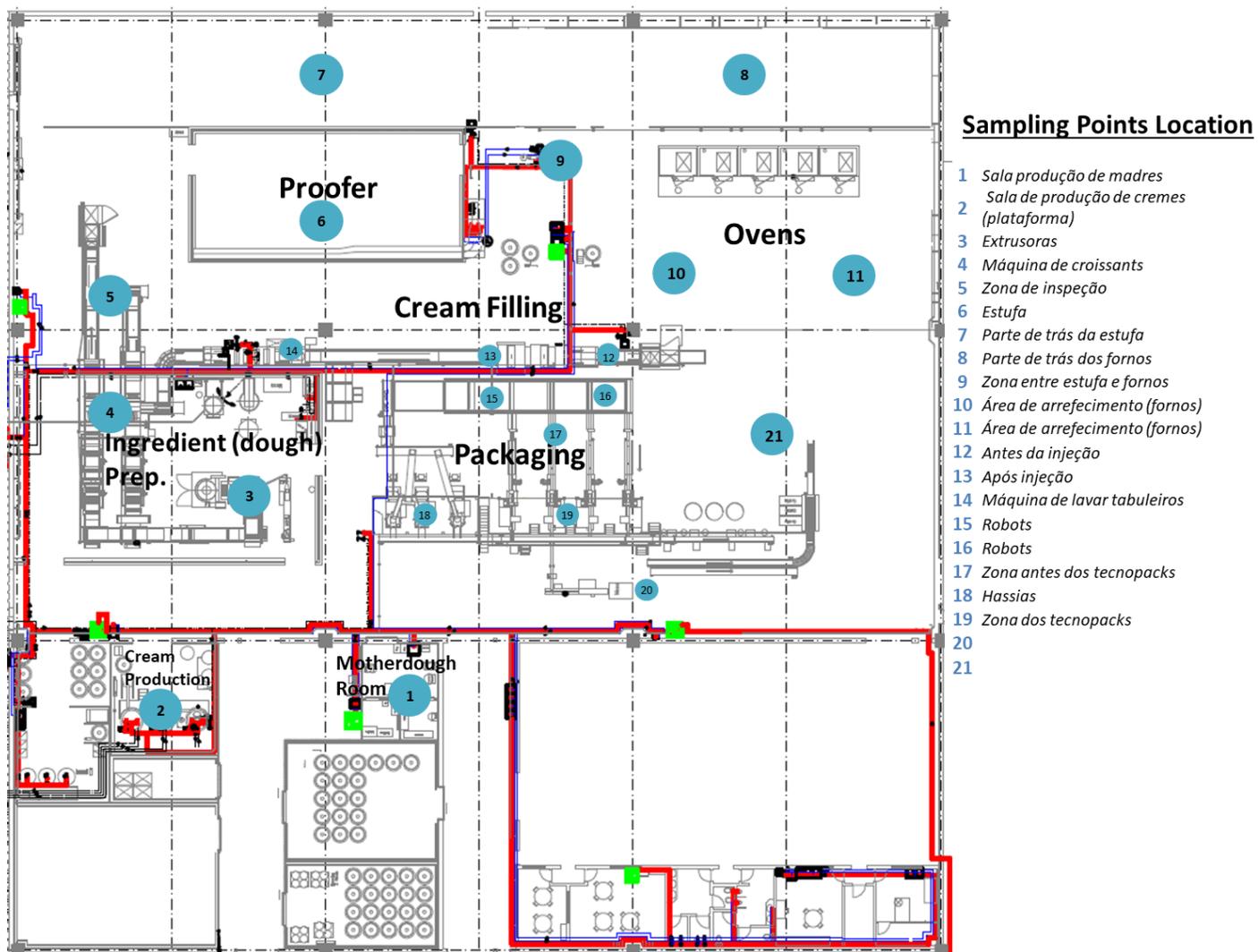


Figura 26 – Localização dos pontos de amostragem ao longo de toda a linha de produção

6.2. Estudo da atividade da água do produto intermédio, produto acabado e cremes

A a_w dos cremes, neste caso o de chocolate, que tem como gama ótima 0,78-0,89, poderá ser relativamente superior à a_w do produto intermédio (produto cozido e ainda sem recheio), o que levaria ao aumento da a_w do produto final e assim elevar a probabilidade de desenvolvimento de microrganismos. Este facto também poderia justificar o desenvolvimento de bolores que se faz notar maioritariamente na zona de injeção, ou seja, nos orifícios que ficam no bolo após a injeção do creme, devido a poder ser, por esta razão, um local com a_w superior. Deste modo, seria importante realizar um estudo acerca das a_w dos bolos nas suas diferentes fases, produto intermédio e produto final, e também dos cremes.

Esta análise passaria pela realização de diversas medições da a_w do produto intermédio, do produto final coincidente com a mesma produção do produto intermédio, mais especificamente com a mesma fornada e do respetivo creme utilizado nessa produção. Para tal, utilizar-se-ia como medidor da a_w o aparelho AquaLab Pre – Water Activity Analyzer, realizando-se o mesmo procedimento utilizado no controlo analítico do produto acabado e dos cremes. Estas análises iriam ser repetidas em diferentes horas na mesma produção e em diferentes produções ao longo de diversas semanas, para se obter o maior número de resultados e assim conseguir retirar conclusões sólidas a partir da comparação desses resultados. Caso se conseguisse justificar que este facto era concordante com a hipótese colocada, ou seja, que efetivamente a a_w dos cremes aumenta substancialmente a a_w do produto final, proporcionando o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes, um estudo futuro passaria por testar formas de diminuir a a_w dos cremes produzidos, ou seja, realizar uma reformulação de produto.

6.3. Sugestões de estudos futuros

Devido ao facto de alguns dos estudos pensados para os parâmetros que foram considerados como possíveis influenciadores do desenvolvimento de microrganismos nos bolos serem longos e demorados, foram deixados como propostas de estudos futuros a serem realizados pela empresa. Um dos parâmetros é a temperatura a que o produto se encontra quando é embalado e o outro parâmetro é o funcionamento das máquinas de embalar o produto.

6.3.1. Temperatura de embalamento

A temperatura a que os produtos se encontram é um parâmetro bastante importante no que toca ao crescimento de microrganismos. Assim, este é um fator que deve ser controlado e bem definido aquando o embalamento e armazenamento dos alimentos.

Como os bolos e croissants após a cozedura são colocados a arrefecer até atingirem uma temperatura de até 30°C, que é a temperatura máxima considerada adequada para o embalamento dos produtos, o embalamento dos bolos e croissants realizado quando estes se encontram a uma temperatura igual ou inferior a 30°C vai evitar a ocorrência de condensações no interior da embalagem. Estas condensações são indesejadas pois fazem aumentar a humidade no interior da embalagem, levando por sua vez ao aumento da probabilidade de desenvolvimento de microrganismos deteriorantes. Deste modo, realizar um controlo apertado da temperatura a que os produtos se encontram quando vão ser embalados é fundamental.

Este estudo passaria pela medição da temperatura dos bolos cilíndricos ao longo de diversas produções e de diferentes momentos na mesma produção, repetindo-se durante um largo número de semanas. Ter-se-ia de se decidir qual a amostragem deste estudo, ou seja, o número de medições de temperatura por tabuleiro e quais os locais, número de repetições por produção e de quanto em quanto tempo e durante quantas produções. Para além disso, recolher-se-iam as amostras embaladas após cada medição de temperatura, para se elaborar o estudo de vida útil e perceber se consoante a temperatura a que são embalados se verifica maior probabilidade de desenvolvimento de bolores. Outra vertente do estudo passaria pelo embalamento de amostras a temperaturas definidas e realizar o respetivo estudo de vida útil, verificando se ocorreria o

desenvolvimento de microrganismos a temperaturas mais propícias para tal. A amostragem nesta vertente do estudo dependeria de quais as temperaturas a serem avaliadas, do número de recolhas por temperatura e do número de repetições, ou seja, do número de produções que se faria o estudo.

No final do estudo, fazendo a interpretação e comparação dos resultados das medições de temperatura e da inspeção visual e/ou análises microbiológicas no estudo de vida útil do produto, poder-se-ia perceber se as temperaturas a que os produtos se encontram quando os operadores os enviam para a embalagem, comprometem a sua segurança. Caso se verificasse este facto, ter-se-ia de proceder ao desenvolvimento de um procedimento mais eficaz e mais controlado no que toca à medição da temperatura a que o produto é embalado. Avaliando o embalamento a diferentes temperaturas específicas, levaria a perceber se a temperatura máxima de 30°C é a mais indicada ou não neste tipo de produtos. Caso se constatasse que é uma temperatura desadequada, a realização de outro estudo para estudar qual a temperatura máxima mais indicada seria fundamental.

6.3.2. Máquinas de embalar

Como se verificou que o estudo correspondente às máquinas de embalar não permitiu retirar conclusões sólidas acerca da sua possível influência na contaminação dos produtos, não sendo os dados existentes representativos, uma vez que não foi verificada uma recolha de amostras uniforme por todas as máquinas de embalar, seria importante realizar um estudo que permitisse perceber se todas as máquinas de embalar se encontram a funcionar de forma correta.

O fator mais importante que pode estar condicionado devido a deficiências no funcionamento das máquinas de embalar é a selagem. Este fator é fundamental para evitar e reduzir a probabilidade de contaminação e o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes nos alimentos. A correta selagem das embalagens é fundamental, uma vez que pode ocorrer a entrada de contaminações e, principalmente, de humidade, que podem comprometer a segurança dos bolos e croissants. Assim sendo, a avaliação do bom funcionamento de todas as máquinas de embalar é importante.

Este estudo centrar-se-ia na recolha uniforme de amostras das quatro diferentes máquinas de embalar bolos cilíndricos, ao longo de diversas produções, em horas

diferentes e controladas e ao longo de várias semanas. Em conjunto com responsáveis da empresa, ter-se-ia de decidir qual a amostragem mais adequada, ou seja, qual o número de amostras a recolher por máquina por cada recolha, quantas recolhas realizar por produção e de quanto em quanto tempo e durante quantas produções realizar o estudo. As embalagens de cada amostra recolhida seriam imediatamente avaliadas, para verificar a existência de anomalias na selagem. Posteriormente, as amostras seriam armazenadas para proceder ao seu estudo de vida útil, avaliando-se o desenvolvimento de microrganismos nos produtos. Após a interpretação dos resultados, verificar-se-ia a partir das amostras recolhidas e dos dados referentes ao desenvolvimento de microrganismos, se cada máquina se encontrava a funcionar da mesma forma ou se alguma(s) tinha a tendência para colocar os produtos em perigo de contaminação.

7. Conclusões

O estágio curricular realizado cumpriu com quase todos os objetivos inicialmente propostos. Devido à pandemia de COVID-19 este teve de ser interrompido a dois meses e meio do seu fim e por essa razão alguns dos trabalhos planeados ficaram por realizar. Ainda assim, de uma forma geral este estágio permitiu a vasta aplicação de conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico em ambiente empresarial, a obtenção de experiência profissional e a contribuição para a garantia da segurança e qualidade alimentar da empresa.

Numa primeira fase, o período de integração foi bastante importante uma vez que permitiu a aquisição de diversos conhecimentos acerca do funcionamento da empresa, bem como de técnicas e métodos laboratoriais de controlo analítico e microbiológico dos produtos e de processos industriais de fabrico destes.

A partir da análise de dados de anos anteriores referentes a parâmetros analíticos, microbiológicos e de produção dos bolos e croissants, foi possível perceber que são vários os fatores que em conjunto poderão estar na base das contaminações microbiológicas que se fazem notar nestes produtos, mais propriamente nos bolos cilíndricos. É de destacar a influência da a_w do produto acabado, bem como possivelmente da influência da a_w dos cremes. Para além disso, a carga microbiológica dos cremes também se mostrou ser um ponto relevante na contaminação dos bolos. Por último alguns factos relacionados com a correta higienização de equipamentos e utensílios também se mostraram propícios a provocar contaminação. Contudo não foram possíveis de confirmar devido à interrupção do estágio já referida. Deste modo, é de salientar que a elaboração futura dos estudos planeados é de interesse, bem como das propostas de estudos referidos neste trabalho para se melhor perceber a influência de alguns parâmetros.

8. Referências Bibliográficas

- (1) Tamang, J. P.; Fleet, G. H. Yeasts Diversity in Fermented Foods and Beverages. In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*; Satyanarayana, T., Kunze, G., Eds.; Springer: US, 2009; pp 169–198.
- (2) Ooms, N.; Pareyt, B.; Brijs, K.; Delcour, J. A. Ingredient Functionality in Multilayered Dough- Margarine Systems and the Resultant Pastry Products: A Review. *Food Sci. Nutr.* 2015, *56(13)*, 2101–2114.
- (3) Beulens, A. J. M.; Folstar, P.; Hofstede, G. J. Food Safety and Transparency in Food Chains and Networks Relationships and Challenges. *Food Control* 2005, *16*, 481–486.
- (4) Aung, M. M.; Chang, Y. S. Traceability in a Food Supply Chain : Safety and Quality Perspectives. *Food Control* 2014, *39*, 172–184.
- (5) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food Safety, Quality and Consumer Protection <http://www.fao.org/docrep/006/y8705e/y8705e03.htm>. (accessed Mar 18, 2020).
- (6) Soman, R.; Raman, M. HACCP System -Hazard Analysis and Risk Assessment, Based on ISO 22000:2005 Methodology. *Food Control* 2016.
- (7) Mortimore, S.; Wallace, C. *HACCP - A Practical Approach*, 3rd editio.; Springer: US, 2013.
- (8) *Codex Alimentarius (2003) - Recommended International Code of Practice General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-200.*; 2003.
- (9) ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. HACCP <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/haccp.aspx> (accessed Mar 20, 2020).
- (10) Regulamento (CE) N.º 852/2004 Do Parlamento Europeu E Do Conselho de 29 de Abril de 2004 Relativo À Higiene Dos Géneros Alimentícios. Parlamento Europeu E Constitucional Da União Europeia. *J. Of. da União Eur.* 2004.
- (11) Schmidt, R. H.; Rodrick, G. E. *Food Safety Handbook*, 1st editio.; Wiley, J., Ed.; Wiley-Interscience: New Jersey, 2003.
- (12) ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Perigos de Origem Alimentar <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx> (accessed Mar 24, 2020).
- (13) Baptista, P.; Venâncio, A. *Os Perigos Para a Segurança Alimentar No*

- Processamento de Alimentos*, 1st editio.; Forvisão - Consultoria em Formação Integrada, Lda.: Guimarães, 2003.
- (14) ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Perigos Físicos - Risco de Asfixia <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/conselhos-praticos-para-os-consumidores/perigos-fisicos-risco-de-asfixia.aspx> (accessed Mar 25, 2020).
 - (15) Gram, L.; Ravn, L.; Rasch, M.; Bartholin, J.; Christensen, A. B.; Givskov, M. Food Spoilage — Interactions between Food Spoilage Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 78, 79–97.
 - (16) Smith, J. P.; Daifas, D. P.; El-khoury, W.; Koukoutsis, J.; El-khoury, A. Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products — A Review. *Food Sci. Nutr.* 2004, 44:1, 19–55.
 - (17) Smith, J. P.; Simpson, B. K. Modified Atmosphere Packaging of Bakery and Pasta Products. In *Principles of Modified Atmosphere and Sous Vide Product Packaging*; Farber, J. M., Dodds, K. L., Eds.; Technomic Publishing Company: Lancaster, 1995; p 207.
 - (18) Axel, C.; Zannini, E.; Arendt, E. K.; Axel, C.; Zannini, E.; Arendt, E. K. Mold Spoilage of Bread and Its Biopreservation: A Review of Current Strategies for Bread Shelf Life Extension. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017, 57:16, 3528–3542.
 - (19) Veld, J. Microbial and Biochemical Spoilage of Foods : An Overview. *Int. J. Food Microbiol.* 1996, 33, 1–18.
 - (20) Jay, J. M. *Modern Food Microbiology*, 6th editio.; Inc., A. P., Ed.; ASPEN: Gaithersburg, Maryland, 2000.
 - (21) Troller, J. Factors That Influence Microbial Growth. In *Safe Practices for Food Processes*; 2001.
 - (22) Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. *Microbiologia de Brock*, 10th editi.; Kyaw, C. M., Maranhão, A. Q., Eds.; Pearson: São Paulo, 2004.
 - (23) Marvig, C. L.; Kristiansen, R. M.; Madsen, M. G.; Nielsen, D. S. Identification and Characterisation of Organisms Associated with Chocolate Pralines and Sugar Syrups Used for Their Production. *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 185, 167–176.
 - (24) Saraiva, M.; Correia, C. B.; Cunha, I. C.; Maia, C.; Bonito, C. C.; Furtado, R.; Calhau, M. A. *Interpretação de Resultados de Ensaios Microbiológicos Em Alimentos Prontos Para Consumo E Em Superfícies Do Ambiente de Preparação E Distribuição Alimentar - Valores-Guia*; Lisboa, 2019.
 - (25) FDA - Food and Drug Administration U.S. *Bad Bug Book*, 2nd editio.; Center for

- Food Safety and Applied Nutrition: Maryland, 2012.
- (26) Stéphane, A.; Vallaeys, T.; Planchon, S. Spore-Forming Bacteria Responsible for Food Spoilage. *Res. Microbiol.* 2016, *168*, 379–387.
- (27) Legan, J. D.; Voysey, P. A. Yeast Spoilage of Bakery Products and Ingredients. *J. Appl. Bacteriol.* 1991, *70*, 361–371.
- (28) Fleet, G. H. Yeast Spoilage of Foods and Beverages. In *The Yeasts, A Taxonomic Study*; Kurtzman, C., Fell, J. W., Boekhout, T., Eds.; Elsevier B.V., 2011; pp 53–63.
- (29) Osimani, A.; Milanovi, V.; Taccari, M.; Cardinali, F.; Pasquini, M.; Aquilanti, L.; Clementi, F. The Occurrence of Spoilage Yeasts in Cream-Filled Bakery Products. *J. Sci. Food Agric.* 2016, *97*(6), 1819–1827.
- (30) Salo, S.; Wirtanen, G. DISINFECTANT EFFICACY ON FOODBORNE SPOILAGE. *Food Bioprod. Process.* 2005, *83*(C4), 288–296.
- (31) Hernández, A.; Pérez-nevado, F.; Ruiz-moyano, S.; Serradilla, M. J.; Villalobos, M. C. Spoilage Yeasts : What Are the Sources of Contamination of Foods and Beverages ? *Int. J. Food Microbiol.* 2018, *286*, 98–110.
- (32) Suhr, K. I.; Nielsen, P. V. Effect of Weak Acid Preservatives on Growth of Bakery Product Spoilage Fungi at Different Water Activities and pH Values. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, *95*, 67–78.
- (33) Filtenborg, O.; Frisvad, J. C.; Thrane, U. Moulds in Food Spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* 1996, *33*, 85–102.
- (34) Milicevic, D. R.; Skrinjar, M.; Baltic, T. Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. *Toxins (Basel)*. 2010, *2*, 572–592.
- (35) Bullerman, L. B.; Bianchini, A. Stability of Mycotoxins during Food Processing. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, *119*, 140–146.
- (36) Abrunhosa, L.; Morales, H.; Soares, C.; Calado, T.; Vila-, A. S.; Pereira, M.; Venâncio, A.; A, A. N. A. S. V. A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. *Food Sci. Nutr.* 2016, *56*:2, 249–265.
- (37) Bennett, J. W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003, *16*, 497–516.
- (38) Food and Agriculture Organization; World Health Organization. *Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food*; 47; 74; Geneva, 2001.

- (39) Zain, M. E. Impact of Mycotoxins on Humans and Animals. *J. Saudi Chem. Soc.* 2011, 15, 129–144.
- (40) Legan, J. D. Mould Spoilage of Bread : The Problem and Some Solutions. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 1993, 32, 33–53.
- (41) Gerez, L. C.; Torino, M. I.; Rollán, G.; Valdez, G. F. Prevention of Bread Mould Spoilage by Using Lactic Acid Bacteria with Antifungal Properties. *Food Control* 2009, 20, 144–148.
- (42) Hartwig, P. A. M.; Mcdaniel, M. R. Flavor Characteristics of Lactic , Malic , Citric , and Acetic Acids at Various pH Levels. *J. Food Sci.* 1995, 60(2), 384–388.
- (43) Marriott, N. G.; Gravani, R. B. *Principles of Food Sanitation*, 5th ed.; Springer: New York, 2006.
- (44) Rangan, C.; Barceloux, D. G. Food Additives and Sensitivities. 2009, 55(5), 292–311.
- (45) Brul, S.; Coote, P. Preservative Agents in Foods Mode of Action and Microbial Resistance Mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 50, 1–17.
- (46) Lambert, R. J.; Stratford, M. Weak-Acid Preservatives : Modelling Microbial Inhibition and Response. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 86, 157–164.
- (47) Marín, S.; Guynot, M. E.; Neira, P.; Bernardó, M.; Sanchis, V.; Ramos, A. J. Risk Assessment of the Use of Sub-Optimal Levels of Weak-Acid Preservatives in the Control of Mould Growth on Bakery Products. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 79, 203–211.
- (48) Guynot, M. E.; Ramos, A. J.; Sala, D.; Sanchis, V.; Marí, S. Combined Effects of Weak Acid Preservatives , pH and Water Activity on Growth of Eurotium Species on a Sponge Cake. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 76, 39–46.
- (49) Diretiva 95/2/CE Do Parlamento Europeu E Do Conselho de 20 de Fevereiro de 1995 Relativa Aos Aditivos Alimentares Com Excepção Dos Corantes E Dos Edulcorantes. 2001.
- (50) Cizeikiene, D.; Juodeikiene, G.; Paskevicius, A.; Bartkiene, E. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria against Pathogenic and Spoilage Microorganism Isolated from Food and Their Control in Wheat Bread. *Food Control* 2013, 31, 539–545.
- (51) Ryan, L. A. M.; Zannini, E.; Dal, F.; Pawlowska, A.; Koehler, P.; Arendt, E. K. International Journal of Food Microbiology Lactobacillus Amylovorus DSM 19280 as a Novel Food-Grade Antifungal Agent for Bakery Products. *Int. J. Food*

- Microbiol.* 2011, *146*, 276–283.
- (52) Valerio, F.; Favilla, M.; Bellis, P. De; Sisto, A.; Candia, S. De; ã, P. L. Antifungal Activity of Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Semolina Ecosystem against *Penicillium Roqueforti*, *Aspergillus Niger* and *Endomyces Fibuliger* Contaminating Bakery Products *S. Syst. Appl. Microbiol.* 2009, *32*, 438–448.
- (53) Phillips, C. A. Review : Modified Atmosphere Packaging and Its Effects on the Microbiological Quality and Safety of Produce. *Int. J. Food Sci. Technol.* 1996, *31*, 463–479.
- (54) Galic, K.; Curic, D.; Gabric, D. Shelf Life of Packaged Bakery Goods — A Review. *Food Sci. Nutr.* 2009, *49:5*, 405–426.
- (55) Erkmen, O. Modified-Atmosphere Storage of Foods. In *Progress in Food Preservation*; Bhat, R., Alias, A. K., Paliyath, G., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, New Jersey, 2012.
- (56) Farber, J. M. Microbiological Aspects of Modified-Atmosphere Packaging Technology - A Review. *J. Food Prot.* 1991, *54*, 58–70.
- (57) Kontominas, M. G. Modified Atmosphere Packaging of Foods. In *Encyclopedia of Food Microbiology*; Batt, C., Tortorello, M.-L., Eds.; Elsevier: Madison, 2014; Vol. 2, pp 1012–1016.
- (58) Decreto-Lei N.º 306/2007 de 27 de Agosto. *Parlam. Eur. e Const. da União Eur.* 2007.
- (59) Bernardi, O.; Garcia, M. V.; Copetti, M. V. Food Industry Spoilage Fungi Control through Facility Sanitization. *Food Sci.* 2019, *29*, 28–34.
- (60) Stanga, M. *Sanitation - Cleaning and Disinfection in the Food Industry*, 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2010.
- (61) PepsiCo Foods. *Sanitation Manual*; 1; New York, 2014.
- (62) Zottola, E. A.; Sasahara, K. C. Microbial Biofilms in the Food Processing Industry - Should They Be a Concern? *Int. J. Food Microbiol.* 1994, *23*, 125–148.
- (63) Shi, X.; Zhu, X. Biofilm Formation and Food Safety in Food Industries. *Trends Food Sci. Technol.* 2009, *20*, 407–413.
- (64) Institute of Internal Auditors (IIA), Definition of internal auditing <http://www.theiia.org/guidance/standards-and-guidance/ippf/definition-of-internal-auditing/> (accessed Oct 15, 2020).