



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária

Mestrado em Engenharia Alimentar

Aplicação da alta pressão na conservação de bombons

Patrícia Coelho Lage

Beja

2017

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária

Mestrado em Engenharia Alimentar

Aplicação da alta pressão na conservação de bombons

**Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar, realizado na empresa
Sugar Bloom, apresentado na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico
de Beja**

Patrícia Coelho Lage

Orientador:

Doutor João Mestre Dias

Co-orientador:

Doutor Nuno Bartolomeu Alvarenga

Beja

2017

À memória do meu avô

Agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para a realização desta tese. Pelo apoio particularmente relevante justifica-se uma menção especial:

Ao Doutor Jorge Saraiva, do departamento de química da Universidade de Aveiro, por ter permitido a utilização do equipamento de alta pressão, bem como pelo auxílio prestado durante a utilização do mesmo.

Ao Doutor João Dias, na qualidade de orientador, pelo rigor científico, pelo sentido prático, pela exigência e pelo empenho demonstrado.

Ao Doutor Nuno Bartolomeu Alvarenga, na qualidade de co-orientador, pela disponibilidade, apoio e incentivo ao longo deste trabalho, assim como na transmissão de conhecimentos e sugestões.

À empresa Sugar Bloom, Unipessoal, Lda, por ter fornecido o espaço físico e material, necessários à confeção dos bombons.

À Engenheira Célia Lampreia, pelo apoio prestado na realização das análises microbiológicas.

À Engenheira Manuela Costa e à Fernanda Fragoso, pelo auxílio na execução de algumas técnicas laboratoriais.

À Maria Diogo e à Libânia Grilo pelo tempo dispensado e pelo apoio técnico e logístico.

Ao meu namorado, pelo apoio permanente e pela leitura cuidada do texto nas suas diferentes fases.

Aos meus pais, irmã e avós pelo apoio e encorajamento permanentes e pela possibilidade que me concederam de realizar o Mestrado.

Resumo

O presente trabalho teve por objectivo a avaliação do tempo de vida útil de bombons submetidos ao tratamento de alta pressão, utilizando como termo de comparação um ensaio controlo, onde os bombons foram apenas mantidos a 20°C e um ensaio em que as amostras foram conservadas a 4°C.

Para tal foi necessário a monitorização das propriedades fisico-químicas, microbiológicas e estruturais dos bombons e a optimização das variáveis envolvidas no processo de produção e conservação: i) seleção do tipo de tratamento (alta pressão, refrigeração ou testemunho); ii) seleção dos ciclos de tratamento (400MPa/2,5 minutos ou 500MPa/1 minuto); iii) temperatura de conservação (20 °C, ou 4 °C); iv) tempo de conservação (dos 0 aos 180 dias).

Relativamente à revisão bibliográfica, foi feita pesquisa acerca dos desenvolvimentos históricos da tecnologia de alta pressão, princípios gerais e descrição do processo, efeito do tratamento, assim como de factores que o possam influenciar.

As metodologias seguidas incluíram a produção de bombons, com recheio constituído por natas e chocolate branco e cobertura de chocolate negro, seguida da avaliação fisico-química (humidade, a_w , pH, cor), microbiológica (mesófilos aeróbios totais, bolores e leveduras) e de reologia.

Os melhores resultados observaram-se no ensaio mantido a 4°C. Comparativamente, no tratamento de alta pressão, o ensaio a 400MPa foi o mais negativo relativamente à humidade e o ensaio a 500MPa o menos eficaz ao nível do a_w , pH, cor e módulo de armazenamento (G'). Contudo, nas análises microbiológicas, este último foi mais eficiente que o anterior (400MPa) e que o testemunho (0,1MPa/20°C).

Palavras-chave: Tempo de vida útil, bombons, alta pressão, conservação, chocolate, reologia.

Abstract

The current investigation had for main concern the evaluation of sugarplum shelf life, submitted to high pressure treatment, using a control test as balance, where praliné were kept at 20°C and a test were the samples were conserved at 4°C.

It was required a monitoring of physicochemical properties, microbiological and structural of praliné and the optimization of the variables involved in the production and conservation process: i) treatment selection (high pressure processing, refrigeration or control); ii) treatment cycles selection (400MPa/2,5minutes or 500MPa/1minute); iii) conservation temperature (20°C or 4°C); iv) conservation time (from 0 to 180 days).

In the literature review, it was searched about the historical developments of high pressure technology, general principles and process description, treatment effect, as the factors that may influence.

The methodologies taken included the production of praliné, with fill made of cream and white chocolate and the coverage of dark chocolate, followed by the physicochemical evaluation (moisture, aw, pH, color), microbiological (aerobic mesophiles, molds and yeasts) and rheology.

The best results were observed in the test at 4°C. Comparatively, in the high pressure treatment, the test at 400MPa was the more negative in moisture concern and the test at 500MPa the less effective at aw, pH, color and storage module (G') levels. However, in microbiological analyzes, the last one was more efficient than the previous (400MPa) and that the control test (at 0,1MPa/20°C).

Keywords: Shelf Life, praliné, high pressure, conservation, chocolate, rheology.

Índice geral

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Índice geral.....	VII
Índice de figuras.....	IX
Índice de tabelas.....	X
Lista de abreviaturas e siglas.....	XI
1. Enquadramento do trabalho e objectivos.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	2
2.1. Desenvolvimentos histórico da tecnologia de alta pressão.....	2
2.2. Tecnologia de alta pressão.....	3
2.2.1. Princípios gerais do processo de alta pressão.....	4
2.2.2. Descrição do processo de alta pressão.....	5
2.2.3. Efeito Temperatura – Pressão.....	9
2.2.4. Vantagens do processo.....	10
2.3. Efeito do tratamento de alta pressão nos alimentos.....	11
2.3.1. Efeito sobre os microrganismos.....	12
2.3.2. Factores relacionados com os microrganismos que influenciam a eficácia do processo	13
2.3.3. Factores intrínsecos relacionados com o alimento que influenciam a eficácia da aplicação de alta pressão.....	16
2.3.4. Factores relacionados com o processo tecnológico.....	17
2.4. Trabalhos com alta pressão desenvolvidos em Portugal.....	19
3. Metodologias.....	21
3.1. Obtenção das amostras.....	21
3.1.1. Tratamento.....	22

3.2.	Material e métodos	24
3.2.1.	Delineamento experimental	24
3.2.2.	Avaliação química	24
a.	Determinação do pH	24
b.	Determinação da actividade da água (Aw)	24
c.	Determinação da humidade	24
3.2.3.	Avaliação física	25
a.	Determinação da cor	25
b.	Análise reológica	25
3.2.4.	Análises microbiológicas	25
a.	Preparação da amostra e das diluições	25
b.	Contagem de Mésofilos totais	26
c.	Contagem de bolores e leveduras	27
3.2.5.	Estatística descritiva e análise de variância	28
4.	Resultados e discussão	29
4.1.	Parâmetros químicos	29
4.2.	Análise Física	31
4.2.1.	Cor	31
4.2.2.	Análise reológica	32
4.3.	Análise microbiológica	33
5.	Conclusão	36
6.	Referências bibliográficas	38

Índice de figuras

Figura 1: Diagrama do princípio isostático	5
Figura 2: Diagrama do processo semi-contínuo de alta pressão	6
Figura 3: Diagrama do processo descontínuo de alta pressão.....	7
Figura 4: Diagrama de geração de alta pressão de forma directa	8
Figura 5: Diagrama de geração de alta pressão de forma directa.....	8
Figura 6: Diagrama histórico de Temperatura-Pressão durante o processo de alta pressão.....	10
Figura 7: Diagrama de resistência dos diferentes tipos de microrganismos.....	14
Figura 8: Esquema fabrico dos bombons	21
Figura 9: Gráficos de Pressão vs. Tempo, dos tratamentos a 400MPa/20°C (a.) e a 500MPa/20°C (b.)	22
Figura 10: Aspecto do bombom depois de submetido ao tratamento de alta pressão.....	23
Figura 11: Equipamento de alta pressão	23
Figura 12: Evolução da humidade.....	29
Figura 13: Evolução da actividade da água (Aw)	30
Figura 14: Evolução do pH	30
Figura 15: Evolução do whiteness index do chocolate de cobertura.....	31
Figura 16: Evolução do whiteness index do recheio	32
Figura 17: Evolução módulo elástico (G')	33
Figura 18: Evolução dos mesófilos totais	34
Figura 19: Evolução dos bolores e leveduras	35

Índice de tabelas

Tabela 1: Identificação das condições dos ensaios	22
---	----

Lista de abreviaturas e siglas

‰: Percentagem

ABTV: Azoto básico volátil total

Aw: Actividade da água

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

FTIR: Fourier Transform-Infrared Spectrometer

G': Módulo armazenamento

h: Hora

HHP: Alta pressão hidrostática.

Hz: Hertz

ISO- International Organization for Standardization

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro

MPa: Mega pascal

NP: Norma portuguesa

°C: Graus celsius

P: Pressão

Pa: Pascal

T: Temperatura

ufc/g: Unidades formadoras de colónias por grama

WI: Whiteness index

1. Enquadramento do trabalho e objectivos

A elaboração da presente tese advém da necessidade de criar produtos com maior tempo de prateleira, que mantenham as suas características químicas e sensoriais o mais originais possíveis, de forma a satisfazer as expectativas e necessidades do consumidor, mas mantendo elevados padrões de segurança alimentar.

Assim, a principal finalidade deste trabalho foi estudar os efeitos da aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática nos atributos de qualidade de bombons, bem como avaliar a eficácia do tratamento como alternativa viável para o aumento do tempo de vida útil deste produto.

Foram avaliadas as condições do tratamento (pressão, tempo e temperatura de conservação), associadas à redução da carga microbiana de deterioração e o seu efeito sobre as características físicas e químicas.

Ao longo deste estudo, pretendeu-se alcançar os seguintes objectivos:

- ✓ Estudo do efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática na redução da carga microbiana, avaliando a resistência de certos microrganismos;
- ✓ Avaliação do efeito do tratamento de alta pressão hidrostática sobre as propriedades físicas, efectuando testes reológicos e detectando alterações de cor;
- ✓ Compreensão dos efeitos do binómio pressão-temperatura dos tratamentos de alta pressão sobre as características microbiológicas, físicas e químicas dos bombons, identificando o valor de pH, Aw e humidade;
- ✓ Identificação do binómio pressão-tempo mais adequado ao tipo de produto.

O trabalho prático foi organizado em 4 ensaios, avaliados mensalmente, ao longo de seis meses (180dias), tendo o trabalho experimental se desenvolvido nas instalações da empresa Sugar Bloom/Mestre Cacau, no departamento de química da Universidade de Aveiro, e nas instalações da Escola superior Agrária de Beja.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Desenvolvimentos histórico da tecnologia de alta pressão

Desde o século XIX que são feitas referências à utilização da alta pressão, como método de conservação de alimentos. Bert Hite, em 1899, demonstrou que a aplicação de pressões na ordem dos 600MPa, durante uma hora, à temperatura ambiente, no leite, permitia prolongar o seu tempo de vida útil devido à redução e inativação de microrganismos. Também, em 1914, conseguiu provar a sua eficácia na utilização de frutas e sumos de fruta, visto que os microrganismos presentes na sua composição eram muito susceptíveis à pressão. Já nos vegetais, concluiu que o emprego de altas pressões era menos eficaz, pelo facto de as bactérias presentes formarem esporos resistentes a este processo (Patterson, 2005).

No início do século XX volta a surgir interesse pela utilização das altas pressões, sobretudo devido à sua grande potencialidade para a indústria. Brindgman, entre 1940 e 1964, contribuiu para esta investigação, tendo sido condecorado com o prémio Nobel da Física. Os seus trabalhos basearam-se principalmente na análise das propriedades dos materiais quando submetidos a altas pressões, no desenvolvimento de procedimentos para a aplicação de alta pressão e na concepção de uma nova geração de equipamentos de alta pressão. Na segunda metade deste século, distinguem-se outros autores como Crossland, que em 1971, investigou a produção industrial de polietileno de alta densidade e o seu corte através da aplicação da alta pressão, tendo em 1973 trabalhado num projecto de equipamentos de alta pressão. Também Poulter, em 1951 e McFarland, em 1973, trabalharam na construção de cilindros e câmaras onde eram pressurizadas as amostras. Já mais tarde, em 1980, Zander dedicou-se à concepção de novos equipamentos de teste de materiais (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

Ou seja, numa fase inicial, a aplicação das altas pressões eram essencialmente ao nível de ensaios físicos e químicos.

Só a partir de meados de 80 do século XX é que foram intensificados os estudos relacionados com o processo de alta pressão aplicado a alimentos, mais concretamente em 1982, na Universidade de Delaware nos Estados Unidos da América e, em 1986, na Universidade de Kyoto no Japão. Daqui resulta a formação de uma sociedade japonesa

de alta pressão e em 1990 o lançamento para o mercado dos primeiros alimentos pressurizados (sumos e compotas), pela companhia japonesa “Meidi-Ya Food Factory Co” (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

Nos últimos quinze anos a utilização de alta pressão no processamento de alimentos tem aumentado (Rivalain *et al.*, 2010) por todo o mundo sendo que mais de 80% equipamentos de alta pressão começaram a ser instalados nas indústrias, sobretudo alimentares, a partir do ano 2000 (Balasubramaniam *et al.*, 2008 citado por Rebelo, 2014). De facto, grandes empresas no Canadá, França, Japão, Espanha e Estados Unidos da América têm recorrido à utilização da alta pressão como forma de pasteurização de diversos produtos comerciais, como guacamole, salsa, sumos, produtos cárneos, cidra, geleias, ostras, entre outros (Lau & Turek, 2007).

Aproximadamente 55% dos equipamentos de alta pressão estão situados nos Estados Unidos da América. Na Europa, espalhados por Espanha, Itália, Portugal, Grécia, França, Reino Unido, Republica Checa, Alemanha, Países Baixos e Bélgica, existem cerca de 25%, sendo a Espanha aquele que possui maior número de equipamentos. Por fim temos a Ásia (Japão, Coreia do Sul e China) com 15% e a Austrália e Nova Zelândia com apenas 5% (Jung *et al.*, 2011).

2.2. Tecnologia de alta pressão

A tecnologia de alta pressão, pelo facto de permitir pasteurizar alimentos a frio e ser uma óptima alternativa à tradicional pasteurização, tem sido alvo de grandes desenvolvimentos e aplicações ao nível industrial nas últimas duas décadas (Szerman *et al.*, 2011).

É do conhecimento geral que os consumidores preferem cada vez mais pagar por produtos alimentares que possuam o mínimo de processamento e de conservantes químicos e com tratamento térmico mais suave possível, sendo possível recorrendo ao processo de alta pressão.

Apesar dos custos de funcionamento serem relativamente baixos e a técnica muito viável, o custo de um equipamento de alta pressão adequado ao uso alimentar é relativamente

elevado. Dependendo do tamanho, pode custar acima de 600 000 euros. Se estes valores reduzirem, possivelmente o uso desta tecnologia venha a crescer (Patterson, 2005). Actualmente, devido aos grandes desenvolvimentos tecnológicos, a aplicação ao nível da indústria propaga-se para uma gama de pressões de 100-800MPa, consoante o objectivo desejado. Na Europa, a comercialização dos produtos sujeitos a processo de alta pressão, têm de estar de acordo com o Regulamento CE nº258/97, de 27 de Janeiro, relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares e que define como novo alimento aquele que tenha sido objecto de um processo de fabrico não utilizado correntemente e que não apresenta risco para o consumidor.

2.2.1. Princípios gerais do processo de alta pressão

A aplicação da alta pressão baseia-se em submeter um produto a elevados níveis de pressão hidrostática (100-1000MPa) de modo contínuo, durante vários minutos (Herrero & Avila, 2006). O processo é isostático, uma vez que a pressão é transmitida uniformemente e instantaneamente, e adiabático, existindo pouca variação da temperatura com o aumento da pressão (a temperatura acresce cerca de 3°C por cada 100 MPa, consoante a composição do alimento), pelo que o tamanho e a forma dos alimentos não é determinante (Rendueles *et al.*, 2011).

Os princípios básicos que determinam o comportamento dos alimentos sobre pressão são: o princípio de Le Chatelier, princípio da ordem microscópica e o princípio isostático (Smelt, 1998; Cheftel, 1995; Rivalain *et al.*, 2010; Yordanov & Angelova, 2010).

De acordo com o princípio de Le Chatelier, qualquer fenómeno que envolva diminuição de volume, como mudança de fase, mudança de conformação molecular ou de reacção química, é favorecido pelo aumento da pressão. Por outro lado, as reacções que envolvam aumento de volume, tendem a ser inibidas pela pressão. Ou seja, no caso de uma reacção, a pressão vai mover o equilíbrio em direcção ao sistema com menor volume. Deste modo, seria de esperar que o aumento da temperatura tinha efeito antagónico, uma vez que resulta num aumento de volume (Cheftel, 1995).

Segundo o princípio de ordenação microscópica, a temperatura constante, um aumento da pressão aumenta o grau de ordenação de moléculas de uma dada substância. Por

consequente, a pressão e temperatura exercem forças antagônicas sobre a estrutura molecular e reações químicas (Yordanov & Angelova, 2010).

Segundo o princípio isostático (Figura 1), ou de Pascal, a pressão é transmitida uniformemente e de forma quase instantânea ao produto, com o tempo da pressurização independente da forma e volume da amostra (Cheftel, 1995). Por outro lado, quando a pressão é aliviada, o produto retorna à sua forma original (Yordanov & Angelova, 2010). Este princípio também identifica um processo adiabático, existindo um aumento da temperatura uniforme e moderado com o aumento da pressão, ou seja, durante a pressurização.

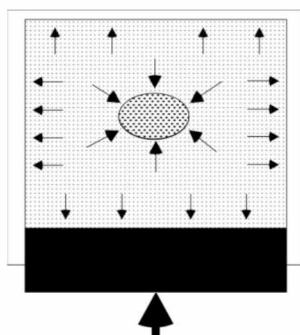


Figura 1: Diagrama do princípio isostático (Yordanov & Angelova, 2010).

2.2.2. Descrição do processo de alta pressão

Os equipamentos de alta pressão hidrostática destinados a alimentos, são constituídos por uma câmara de pressurização cilíndrica, um gerador de pressão, formado por um sistema de bombeamento com bomba hidráulica, multiplicador de pressão e um sistema de controlo de temperatura (Herrero & Avila, 2006). Estes podem trabalhar de forma semi-contínua (processo *Bulk*) ou descontínua (processo *Batch*) (Yuste *et al.*, 2001).

No processamento semi-contínuo (Figura 2), com capacidade de produção de 1 a 4 toneladas/hora, são utilizados alimentos líquidos não embalados, onde um pistão livre é usado para aumentar a pressão sobre o produto. O alimento é introduzido a partir de uma bomba de baixa pressão e quando a câmara fica preenchida, o pistão livre é movido. Nesta altura, o orifício de entrada é fechado e a água do processo de alta pressão é introduzida atrás do pistão livre, para comprimir o alimento. O tratamento de pressão pode ser feito entre 3000 e 6000 bar e a temperaturas entre -20°C e 80°C, consoante o equipamento

utilizado (Chawla , 2011). Terminado o processo, o produto é embalado assepticamente (Herrero & Avila, 2006; Yuste , 2001). Nestes equipamentos, podem existir três ou mais camaras em paralelo, a trabalhar em sequência, com o mesmo gerador de pressão. Deste modo, permitem processar grandes quantidades de produto e trabalhar por longos períodos de tempo, sem paragens. Contudo, acarretam custos muito elevados (Patterson , 2006). Neste tipo de processo, o equipamento de alta pressão deve ser parte de uma linha asséptica e as partes em contacto com o alimento devem estar limpas e esterilizadas (Palou , 2007).

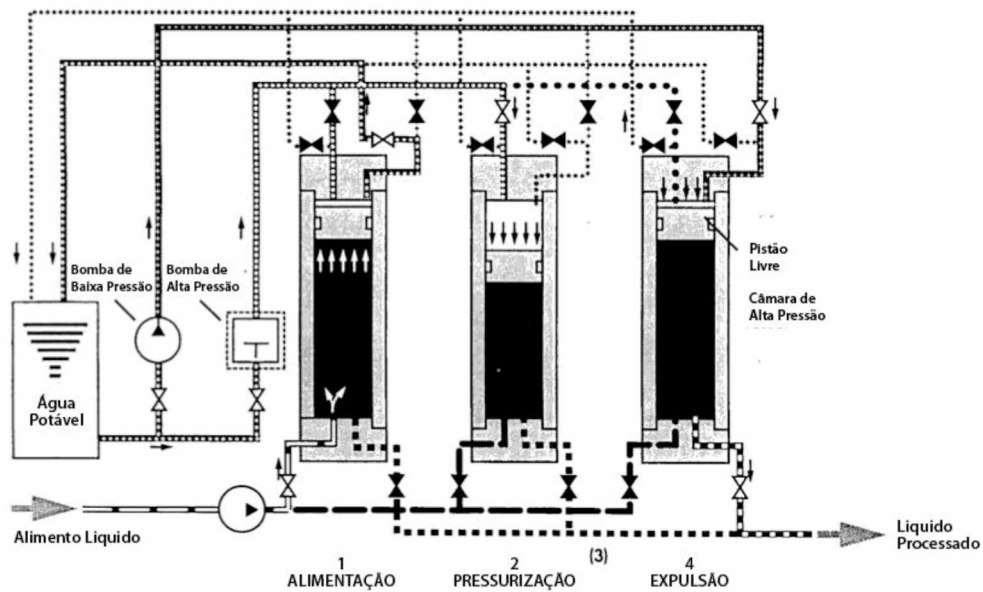


Figura 2: Diagrama do processo semi-contínuo de alta pressão (adaptado de Chawla , 2011).

Na operação descontínua (Figura 3), os alimentos embalados (sólidos ou líquidos) são colocados dentro da camara de pressão, com 10 a 500 litros de capacidade, a qual é selada (Chawla , 2011; Herrero & Avila, 2006). As embalagens devem ser de plástico flexível, tolerantes a reduções de volume de 15% e resistentes a forças de compressão, para que mantenham o alimento com a sua integridade física. É muito importante que os gases existentes no interior da embalagem sejam removidos para evitar que a eficácia de pressurização seja reduzida (Patterson , 2006). De seguida, é colocado fluido de pressurização no seu interior, por meio de uma bomba de baixa pressão, substituindo o ar no interior da camara, até esta ficar completamente preenchida. Neste momento, a pressão é elevada por uma bomba de alta pressão, ficando a pressão, durante uma combinação de tempo-pressão específica, em contacto com o produto, diminuindo o seu volume. Após este período a válvula de libertação de pressão é aberta, permitindo que o fluido de

pressurização se expanda e retorne à pressão atmosférica (descompressão). Por fim a câmara é aberta e a comida embalada é retirada, estando pronta para distribuição e o equipamento apto a iniciar novo processo (Chawla , 2011; Herrero & Avila, 2006). Este processo não apresenta perigo de contaminação cruzada e não exige a limpeza do equipamento entre as diferentes utilizações, quando comparado com o processo semi-contínuo (Chawla , 2011). Outra vantagem, é o facto da taxa de produção poder ser aumentada, através do uso dos vasos de pressão em sequência, sem que haja falhas nos tempos de processamento e assim o sistema funcionar sequencialmente (Palou , 2007).

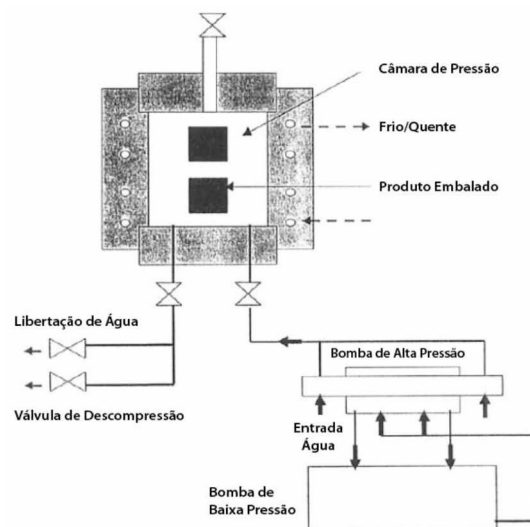


Figura 3: Diagrama do processo descontínuo de alta pressão (adaptado de Chawla , 2011).

A alta pressão pode ser gerada por compressão directa, compressão indirecta ou aquecimento do meio de pressurização.

A compressão directa (Figura 4), a pressão é produzida por pressurização do meio através de um pistão de diâmetro pequeno, permitindo compressões muito rápidas. No entanto, as limitações na vedação entre o pistão e a superfície interna da câmara tornam desvantajosa a sua utilização ao nível industrial, sendo mais utilizado em pequenos laboratórios (Téllez-Luis , 2001).

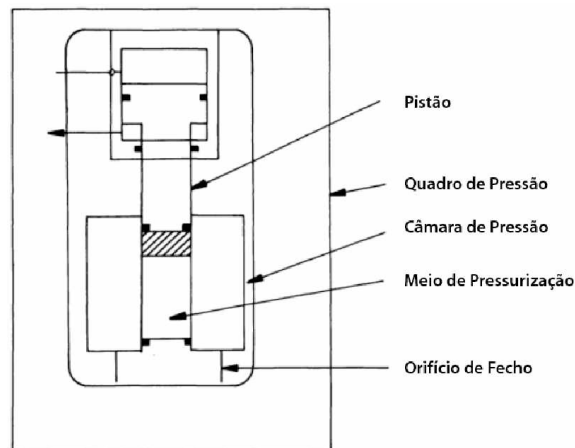


Figura 4: Diagrama de geração de alta pressão de forma directa (adaptado Sangronis , 1997).

Na compressão indirecta (Figura 5) usa-se um intensificador de alta pressão para bombear o fluido de pressurização até a camara de pressão e alcançar assim a pressão desejada. Este é o método mais usado a nível industrial, baseando-se na propriedade de expansão do meio pressurizante quando é aplicada uma determinada temperatura, produzindo um aumento da pressão. O efeito concretiza-se quando se combinam altas pressões com altas temperaturas (Sangronis , 1997).

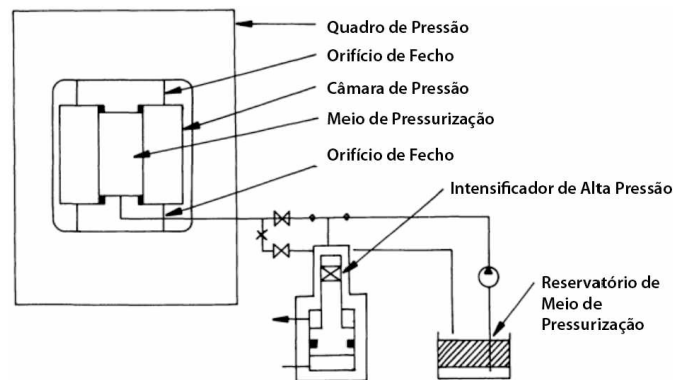


Figura 5: Diagrama de geração de alta pressão de forma indirecta (adaptado Sangronis , 1997).

No aquecimento do meio de pressurização, a temperatura é elevada para que o fluido de pressurização expanda e gere alta pressão. Este método é usado quando a alta pressão é aplicada de forma combinada com a alta temperatura e requer um controlo de temperatura bastante exacto, no interior da camara de pressão (Palou , 2007).

A pressurização pode ainda ser gerada por: sistema de pressão isostática a frio, a temperatura média e a quente.

A primeira técnica processa-se à temperatura ambiente, a pressões entre os 50 e os 600 MPa, com tempos de tratamento entre 1 a 30 minutos. No processamento alimentar os tempos de tratamento variam entre 5 e 20 minutos e as pressões aplicadas nunca são inferiores a 400MPa nem superiores a 900MPa. Neste processo, os materiais em pó são colocados num molde elastómero e submetidos a altas pressões. Hoje em dia é o sistema mais usado na indústria alimentar (Téllez-Luíz , 2001).

No sistema de pressão a temperatura média, usado quando ocorrem reações químicas durante a pressurização, existe uma combinação entre as pressões altas e intervalos de temperaturas de 20°C a 250°C (Palou , 2007).

Já no sistema de pressurização a quente, são utilizados níveis de pressão entre 100 e 400 MPa, temperaturas muito altas (iguais ou superiores a 2000°C), intervalos de tempo que variam entre a 6 e 12 horas e como meio de pressurização um gás (árgon, hélio e/ou nitrogénio). Esta prática permite que o produto fique uniformemente pressurizado sendo muito utilizada na indústria metalúrgica e de cerâmicas (Barbosa-Cánovas , 1998).

2.2.3. Efeito Temperatura – Pressão

Durante a fase de compressão (T1-T2) do tratamento de pressão, os produtos sofrem um decréscimo de volume devido à pressão (Figura 6). O produto é mantido sobre pressão durante certo período de tempo (T2-T3) antes da descompressão (T3-T4). Após a descompressão, o produto regressa ao seu volume inicial. A compressão e descompressão podem resultar numa alteração de temperatura, no produto, durante o tratamento. A temperatura do alimento (T1-T2) aumenta como resultado da compressão física (P1-P2). A temperatura do produto (T2-T3), durante o processo de pressão (P2-P3), é independente da taxa de compressão, desde que o calor alterne entre o produto e as suas imediações. Num sistema isolado (adiabático), o produto regressará a sua temperatura inicial após descompressão (P3-P4). Na prática, o produto irá regressar à temperatura T4, ligeiramente inferior á temperatura inicial T1, como resultado das perdas de calor durante a fase de compressão. O rápido aquecimento e arrefecimento resultantes do tratamento de alta pressão oferecem uma forma única de aumentar a temperatura do produto apenas durante o tratamento e de reduzi-la rapidamente após o mesmo (Yordanov & Angelova, 2010).

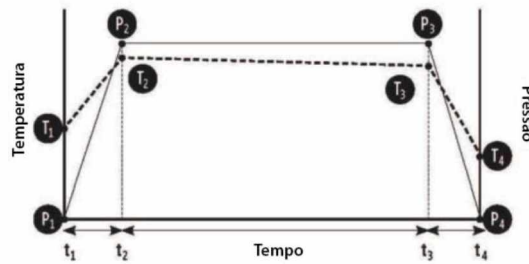


Figura 6: Diagrama histórico de Temperatura-Pressão durante o processo de alta pressão (adaptado de Yordanov & Angelova, 2010).

2.2.4. Vantagens do processo

Esta tecnologia apresenta várias vantagens, em relação a outras formas de conservação, tais como:

- Origina a aquisição de produtos de elevada qualidade, uma vez que não sofrem alterações ao nível sensorial, nutricional e funcional, podendo ser tratados à temperatura ambiente (Jofré , 2010; Chawla , 2011; Garriga , 2002);
- Inactiva enzimas e microorganismos, sem provocar alterações nos seus componentes, como vitaminas (Sangronis , 1997);
- Devido à destruição de microorganismos patogénicos, garante alimentos seguros (Garriga ,2004);
- Permite estender o período de vida útil dos produtos, pelo facto de inactivar enzimas e bactérias responsáveis por alterações nos alimentos (Sangronis , 1997);
- A utilização de conservantes químicos passa a ser mais reduzida ou até mesmo desnecessária (Téllez-Luis, , 2001);
- Pode ser utilizada em alimentos sensíveis ao calor (Clariana , 2011),
- Permite cozinhar a baixa temperatura;
- Custos operacionais menos dispendiosos que a pasteurização;
- O processo é independente do volume e geometria dos alimentos (Norton & Sun, 2008), permitindo processar elevadas quantidades de produto (Téllez-Luis, , 2001; Sangronis , 1997);
- Apresenta impacto ambiental muito reduzido, já que origina poucos ou nenhuns resíduos e utiliza apenas água e electricidade (Patterson , 2006).

Apesar de apresentar inúmeras vantagens, esta tecnologia também tem as suas desvantagens:

- O custo do equipamento é elevado (Patterson, 2005);
- Ainda não pode ser aplicada a produtos com baixo grau de acidez (alguns vegetais, leite e sopa), devido ao facto de ser incapaz de destruir grande parte dos esporos, sem que sejam submetidos a elevadíssimas temperaturas (Ramaswamy , 2004);
- A aplicação da alta pressão não é possível em alguns alimentos, uma vez que provoca a sua deformação e alteração de aspecto (Téllez-Luis, , 2001);
- Se o produto não tiver água na sua constituição, não possui humidade suficiente para que a destruição dos microrganismos seja eficiente (Ramaswamy , 2004).

2.3. Efeito do tratamento de alta pressão nos alimentos

O interesse pelo tratamento por alta pressão, em alimentos, tem vindo a aumentar nos últimos anos, devido sobretudo a trabalhos de investigação em diferentes alimentos que relatam efeitos benéficos. É uma alternativa interessante aos tradicionais métodos de conservação de alimentos uma vez que permite aumentar a segurança microbiológica e o tempo de vida útil dos alimentos, através da inativação de patogénicos, organismos de deterioração e de algumas enzimas, com efeitos limitados ao nível das ligações covalentes que resultam em alterações mínimas ao nível da qualidade organolética e nutricional (Patterson , 2006; Oey , 2008).

Os alimentos são matrizes complexas e com diferentes componentes na sua constituição que estão constantemente em interação, podendo ocorrer durante o processo de alta pressão reações em simultâneo como: ruptura da membrana e parede celular, processos de conversão da enzima catalisada, modificação de biopolímeros e inativação enzimática e desnaturação de proteínas com formação de gel (Oey , 2008).

Assim, o principal objectivo da utilização das altas pressões é a redução da carga microbiana, mantendo o máximo de qualidade, sendo que a eficácia desta redução depende de vários factores que devem ser considerados de forma a otimizar o processo (Patterson , 2006).

Desta forma, para obter o efeito desejado, há que jogar com diferentes combinações de pressão, temperatura e tempo, adequados ao tipo de produto. Caso contrário, durante o período de armazenamento poderão ocorrer reações de oxidação e reações bioquímicas com enzimas e microrganismos que não tenham sido devidamente inativados (Oey , 2008).

2.3.1. Efeito sobre os microrganismos

A inativação de microrganismos por alta pressão é provavelmente o resultado de uma combinação de factores, sendo a morte celular consequência de uma serie de danos acumulados no interior da célula (Hugas *et al.*, 2002). Deste modo, o efeito das altas pressões sobre os microrganismos pode resumir-se em três aspectos: aumento da permeabilidade das membranas celulares, desnaturação de polímeros e proteínas, incluindo a inativação de enzimas e a diminuição de síntese de DNA (Herrero & Avila, 2006).

A membrana celular é o principal alvo de danos (Hugas *et al.*, 2002), uma vez que a alta pressão provoca a cristalização dos fosfolípidos que resulta em alterações na estrutura e permeabilidade da membrana (Cheftel & Culioli, 1997). Várias alterações morfológicas são observadas a pressões crescentes: compressão de vacúolos, alongamento da célula, separação da membrana celular da parede celular, contração da parede celular com a formação de poros, modificações na forma do citoesqueleto, modificações do núcleo e organelos intracelulares, coagulação da proteína citoplasmática. Estas alterações irão provocar a libertação dos componentes intracelulares para fora da célula (Cheftel, 1995), especialmente a partir de 400MPa (Farr, 1990).

Também se verifica a desnaturação de proteínas e a redução da actividade de enzimas, perturbando a função da membrana celular que pode levar a perdas através da membrana interna e externa. Assim, as enzimas ficam susceptíveis, sendo a sua inativação fruto das alterações das estruturas intermoleculares e na conformação do centro activo, cuja inativação é afectada por factores como o pH, concentração do substrato, estrutura das subunidades da enzima e temperatura (Patterson, 1999). As condições de desnaturação variam consoante as enzimas, refletindo a estrutura individual de cada uma delas (Farr,

1990). Apesar da hélice de DNA permanecer estável, pelo facto das ligações de hidrogénio serem favorecidas pela pressão (Cheftel, 1995), os mecanismos genéticos como a transcrição e tradução de DNA são inibidos, uma vez que as enzimas são mediadoras de algumas etapas. Deste modo, a replicação e tradução podem ser interrompidas pela pressão (Aymerich, 2008).

A extensão da inactivação alcançada pela pressão depende de uma serie de factores que interagem entre si, os quais devem ser considerados ao projetar as condições do processo, de forma a garantir a segurança microbiológica e a qualidade dos alimentos processados e tratados pela alta pressão (Patterson, 2006).

A taxa e a cinética de inativação dos microrganismos dependem de uma serie de parâmetros como: combinação pressão-tempo-temperatura; tipo de microrganismo; característica das estirpes (gram-positivas são mais resistentes que gram-negativas); morfologia da célula bacteriana (cocos mais exigentes que bacilos); fase de crescimento dos microrganismos (na fase estacionária encontram-se mais resistentes que na fase exponencial); composição dos alimentos (nutrientes, pH, actividade da água) (Hugas *et al.*, 2002; Rebelo, 2014).

2.3.2. Factores relacionados com os microrganismos que influenciam a eficácia do processo

Os esporos são a forma de vida mais resistente a factores adversos, incluindo o calor, dessecação, radiação e produtos químicos. Deste modo, a sua eliminação através da pressão passa por dois tratamentos. Primeiro a germinação dos esporos para que estes fiquem mais sensíveis, seguida da morte dos mesmos (Setlow, 2008).

Relativamente às bactérias vegetativas, resultados sugerem que as bactérias gram-negativas são inactivadas a uma pressão inferior às gram-positivas. Este fenómeno está relacionado com o facto de a membrana celular das gram-negativas apresentar uma estrutura mais complexa (Shigehisa *et al.*, 1991). As diferenças na composição e estrutura da membrana celular dos microrganismos são determinantes na resistência a altas pressões (Rendueles *et al.*, 2011). Cocos gram-positivos como *Enterococci* e

Staphylococcus aureus são mais resistentes ao calor e à pressão do que os bacilos gram-negativos como *Campylobacter jejuni* e *Pseudomonas aeruginosa* (Patterson, 1999).

Os fungos que se dividem em unicelulares (leveduras) e hifas (bolores), são em geral, susceptíveis a pressões relativamente baixas. As leveduras não sendo patogénicas são um grupo importante na degradação de alimentos, sobretudo ao nível das frutas (Norton & Sun, 2008), conseguindo desenvolver-se em meios onde a actividade da água (A_w) é baixa e tolerando concentrações relativamente elevadas de ácidos orgânicos (Patterson *et al.*, 2006). O tratamento com pressões inferiores a 400MPa, durante alguns minutos pode ser suficiente para inactivar leveduras, no entanto algumas estirpes podem apresentar uma taxa lenta de crescimento a pressões de 500MPa (Norton & Sun, 2008). Ao contrário das leveduras, certos bolores são tóxicos, podendo apresentar problemas na segurança dos alimentos (Patterson *et al.*, 2006), e com um papel importante na deterioração, fermentação e em processos de biodegradação. Pressões entre 300 e 600 MPa podem inativar a maioria dos bolores (Norton & Sun, 2008). Em geral, os microrganismos gram-negativos são os mais sensíveis as altas pressões, seguindo-se as leveduras e bolores, os microrganismos gram-positivos e por fim os esporos (Téllez-Luis *et al.*, 2001).



Figura 7: Diagrama de resistência dos diferentes tipos de microrganismos

As viroses possuem uma vasta amplitude de resistência à alta pressão, resultante da sua diversidade estrutural, no entanto verifica-se que os vírus encapsulados normalmente são mais resistentes do que os não encapsulados. Estudos realizados sobre a hepatite A mostraram que melhores amplitudes de inativação são alcançadas em temperaturas refrigeradas e, por outro lado, factores externos como a força iónica do substrato e a temperatura (Rendueles *et al.*, 2011) condicionam a eficácia do processo. Alguns estudos mostram que o vírus poliomielite é relativamente resistente à pressão visto que meios de cultura com este vírus em suspensão, quando submetidos a um ciclo de 450MPa durante 5 minutos a 21°C, não mostraram redução das unidades formadoras nas placas. Outros resultados revelam que vírus como a hepatite A e retrovírus humano foram mais sensíveis

à pressão, sugerindo que os mesmos tratamentos utilizados para inativar bactérias vegetativas podem ser suficientes para desactivar partículas de vírus humanos (Patterson *et al.*, 2006).

Existe pouca informação acerca do efeito da alta pressão nos parasitas. Os estudos levados a cabo até agora incidiram sobre protozoários e nematoides. Oócistos, formas resistentes de parasitas protozoários, quando em parasitas como *Cryptosporidium parvum* ou *Toxoplasma gondii*, são facilmente inativados entre 340MPa e 550 MPa, num período de tempo não superior a 3 minutos. A viabilidade dos oócistos baseia-se na sua capacidade de libertar esporozoítos e após a alta pressão, apesar de os oócistos ao apresentarem alterações morfológicas, a integridade dos esporozoítos é afectada, visto que a sua morfologia é alterada. Estudos efectuados em nematoides como *Ascaris suum* ou *Anisakis simplex* demonstraram que a uma baixa pressão (200MPa) aplicada não mais que 10 minutos, é suficiente para inactivar estes parasitas (Rivalain *et al.*, 2010).

Em geral, quanto maior complexidade de um organismo, maior é a sua sensibilidade ao tratamento por alta pressão. Assim podemos definir os microrganismos Eucariotas como sendo mais susceptíveis à pressão do que os procariotas (Yuste *et al.*, 2001).

Estudos demonstram que as células de *Escherichia coli*, em fase exponencial, desenvolvidas a baixa temperaturas (Psicrófilas) foram mais resistentes à alta pressão do que as desenvolvidas a alta temperatura. Ainda foi possível verificar que as células microbianas aumentaram a proporção de ácidos gordos insaturados nas membranas, em resposta à descida de temperatura, sendo possível concluir que existe ligação entre a fluidez da membrana e a resistência à pressão (Casadei & Mackey, 1999), de onde se conclui que quanto mais rígida for a membrana, menor é a resistência à pressão (Cheftel, 1995). Microrganismos que possuam menor proporção de ácidos gordos apresentam maior resistência à pressão, devido ao menor grau de cristalização (Cheftel, 1995).

As células em fase estacionária de crescimento são geralmente mais resistentes à pressão do que o da fase exponencial. Quando as bactérias entram na fase estacionária não conseguem sintetizar novas proteínas para proteger as células contra uma variedade de condições adversas (Patterson, 1999).

2.3.3. Factores intrínsecos relacionados com o alimento que influenciam a eficácia da aplicação de alta pressão

A composição do substrato tem efeito significativo na resposta que os microrganismos têm relativamente à pressão, podendo existir diferenças significativas no nível de inativação de um mesmo organismo, em substratos diferentes (Patterson *et al.*, 2006).

O pH do alimento é um dos principais fatores que afetam o crescimento e sobrevivência, uma vez que todos os microrganismos têm uma gama de pH dentro do qual conseguem crescer, correspondendo o pH óptimo ao valor mais favorável ao seu desenvolvimento (Norton & Sun, 2008).

Leveduras e bolores são resistentes ao pH baixo, especialmente para valores inferiores a pH=4, onde dificilmente se verificam alterações provocadas pela pressão. Em comparação, a bactéria vegetativa é bastante sensível à pressão, ao calor e a pH baixo. Por outro lado, os esporos bacterianos são mais resistentes ao tratamento de alta pressão a pH neutro, mas quando inactivados indirectamente, durante a germinação entre 50-300MPa, tornam-se mais sensíveis à pressão a pH neutro. Já a bactéria é mais sensível quando o pH se encontra abaixo do óptimo, após tratamento de calor ou pressão. Ou seja, o pH pode melhorar a inativação durante o tratamento e inibir a recuperação e crescimento de células já lesadas pela pressão ou calor (Smelt, 1998).

Não são observados efeitos específicos nos ácidos orgânicos, excepto pH. Isto pode dever-se ao facto da pressão favorecer a ionização e de os ácidos orgânicos serem particularmente inibitórios na forma indissociada (Hugas *et al.*, 2002). De facto, o ácido láctico na forma dissociada, penetra no interior das células e diminui o pH intracelular. (Diez *et al.*, 2008).

A redução da actividade da água (A_w) aumenta a resistência microbiana. De fato, a eficácia da alta pressão diminui com actividade da água reduzida, sendo visivelmente observada para valores abaixo de 0,9. Este fenómeno também se verifica em esporos, como de *Bacillus cereus*, podendo ser atribuído para a germinação incompleta, em condições de baixa disponibilidade de água (Rendueles *et al.*, 2011). A reduzida actividade água provoca atrofia celular e aumento da espessura da membrana celular, diminuindo o tamanho da célula, que se reflecte no aumento da resistência (Wells-Bennik

et al., 2008). Contudo, microrganismos já lesados tornam-se mais sensíveis com baixa atividade da água, pelo que a sua recuperação é impedida (Norton & Sun, 2008).

Ainda, ingredientes alimentares como cloreto de sódio, glicose, frutose, sacarose, xilitol e glicerol podem conferir resistência dos microrganismos, relativamente à pressão (Yuste *et al.*, 2001).

2.3.4. Factores relacionados com o processo tecnológico

O efeito inibitório da pressão sobre os microrganismos, além de depender de uma série de factores intrínsecos, relacionados com os próprios microrganismos e com a natureza do substrato, também é influenciado por variáveis extrínsecas, associadas ao processo tecnológico, ou seja, ao nível de pressão, à duração e à temperatura do tratamento (López-Caballero *et al.*, 2002).

Para compreender e antever o efeito do tratamento torna-se importante fazer uma previsão das temperaturas de incubação dos microrganismos específicos do alimento em causa (Rendueles *et al.*, 2011), de forma a ajustar a temperatura adequada durante a pressurização, já que influencia o intervalo de inactivação de células microbianas (Yordanov & Angelova, 2010).

As taxas de inactivação obtidas são maiores quando o processo se realiza a temperaturas acima ou abaixo da temperatura ambiente (Yuste *et al.*, 2001). Estudos relataram que a inativação por pressão de *S. bareilly*, *V. parahaemolyticus* e *S. aureus* foi superior a -20°C do que a 20°C. Outros autores mostraram que a resistência microbiana é máxima a temperaturas entre 15°C e 30°C (Wells-Bennik *et al.*, 2008). A baixas temperaturas ocorrem alterações na estrutura e fluidez da membrana celular, devido ao enfraquecimento de interações hidrofóbicas e de cristalização de fosfolípidos (Rendueles *et al.*, 2011), sendo que quanto menor for a fluidez das membranas, maior é a sua sensibilidade à pressão (Wells-Bennik *et al.*, 2008).

A aplicação de temperaturas moderadas (entre 40°C e 60°C) pode melhorar a inativação microbiana por pressão, permitindo em alguns casos aplicar níveis de pressão inferiores (Rendueles *et al.*, 2011). Uma vantagem da aplicação da alta pressão a uma temperatura

baixa ou moderada é permitir inactivar certas enzimas e destruir microrganismos, sem provocar alterações no produto, sobretudo a nível sensorial (Garriga *et al.*, 2004).

Temperaturas no intervalo de 50°C e 70°C permitem melhorar consideravelmente a inativação microbiana induzida por alta pressão (Yuste *et al.*, 2001). De facto, o processo realizado a temperaturas elevadas tem sido considerado como a forma mais prática de conseguir vencer a resistência à pressão demonstrada por algumas algumas estirpes (Patterson, 2005).

Estudos levados a cabo em leite de ovelha, mostraram que o ciclo a 450MPa, a 2°C durante 15 minutos obteve resultados mais eficazes na inativação de *L. innocua* que o mesmo tratamento a 25°C, mas menos eficaz que o tratamento a 50°C (Patterson, 2005).

A eficácia do tratamento depende também do nível de pressão atingida e da duração do tratamento (Garriga *et al.*, 2004). Geralmente, de forma não linear, pressões mais elevadas e tempos de tratamento mais longos conduzem a letalidades mais elevadas (López-Caballero *et al.*, 2002). Uma taxa de pequenas alterações pode induzir uma resposta de stress e assim tornar o processo menos efectivo e como tal normalmente uma taxa de pressurização rápida pode contribuir para uma inativação mais veloz (Smelt, 1998). Do mesmo modo, tratamentos em que o processo é dividido em vários ciclos, constituídos por altas pressões ou alternância entre pressões moderadas e elevadas, são referidos como sendo mais eficazes do que tratamentos contínuos, relativamente a inibição de células vegetativas bacterianas e esporos (Yuste et l., 2001).

Ainda se verificou que a aplicação simultânea de pressão (até 700MPa) e aquecimento suave (acima de 60°C) foi mais letal que cada um dos tratamentos isolados, em *E. coli* O157:H7 e *S. aureus*, em leite e carne de aves de capoeira (Patterson *et al.*, 2006).

No tratamento por pressão, a alteração de temperatura, quase sempre representam um papel importante, devido ao aquecimento adiabático. Em adição há muito interesse no efeito combinado da temperatura e pressão, como método efectivo na inativação de microrganismos.

Assim, sendo a pressão semelhante ao calor, existe um limiar, que varia consoante o microrganismo, abaixo do qual não ocorre qualquer inactivação. Acima deste limiar, o

efeito letal do processo tende a aumentar à medida que a pressão aumenta, mas não necessariamente com o tempo (Patterson *et al.*, 2006).

2.4. Trabalhos com alta pressão desenvolvidos em Portugal

Em Portugal, já foram publicados vários trabalhos onde foram estudados os efeitos do tratamento de alta pressão em diversos produtos. Madeira (2013) estudou a ação conjugada de pectinases, da tecnologia de alta pressão no tratamento de sumos e pasteurização, de modo a obter um sumo clarificado e isento de microrganismos. Foram selecionadas pectinases de *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus niger*, tendo sido avaliada a atividade destas através do método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) que consiste na determinação da concentração de glucose a partir da degradação da pectina. As enzimas foram imobilizadas pelo método de inclusão, usando quitosano como suporte. A imobilização e o processamento a alta pressão mostraram ser eficazes na proteção destas enzimas a temperaturas elevadas. No entanto, no sumo, a temperatura elevada provocou uma diminuição da atividade das enzimas, impedindo a realização da pasteurização em simultâneo. Deste modo, os melhores resultados no sumo foram obtidos a 45°C e à pressão de 200 MPa. A pectinase de *Aspergillus aculeatus* mostrou ser mais eficaz na clarificação do sumo, apresentando uma atividade superior à pectinase de *Aspergillus niger*.

Ferreira (2011) analisou o efeito do tratamento de alta pressão ao nível da ligação da água ao amido e nas isotérmicas de adsorção e desorção de amido, com objetivo de verificar a diferença de comportamentos entre o amido pressurizado e o amido não pressurizado em relação à sorção de água, que poderá ter implicações em alimentos que contenham amido. Processaram-se suspensões de amido de milho comercial na presença de água, a uma pressão de 300 MPa em diferentes tempos de pressurização (5, 15, 30 e 60 minutos). Concluiu-se que o aumento do tempo de pressurização influenciou a quantidade de água não centrifugável ligada ao amido (4,9% de água retida na pressurização a 60 minutos). Martins (2014) avaliou o efeito do tratamento de alta pressão, de acordo com diversos níveis de pressão e tempo, sobre as características microbiológicas físicas da tripa de suíno, por meio de análises microbiológicas, testes de resistência mecânica, medições de cor, análises histológicas e medições de ângulo de contato de superfície. Verificou-se

eficácia na eliminação de contaminantes microbiológicos do próprio produto, sendo que no tratamento a 400MPa durante 1800segundos, as contagens de microrganismos apresentaram valores inferiores a 1 log ufc/g. Por outro lado, foram verificadas alterações nos parâmetros $L^*a^*b^*$ de cor nas tripas submetidas a alta pressão.

Também Mendonça (2012) comprovou a eficácia do processo de alta pressão, como inibidor de microrganismos, submetendo enchidos, inoculados com *Staphylococcus xylosus* (primeiro modelo) e com *Listeria monocytogenes* (segundo modelo), a pressões de 50-250MPa, sendo que no primeiro modelo a temperatura do processo foi controlada (1-30°C), durante 30 minutos e no segundo modelo a temperatura manteve-se fixa (15°C), durante 5 a 60 minutos.

Rosendo (2014) estudou o tratamento de alta pressão isoladamente e em conjunto com solução de ácido cítrico (1%), como alternativa às convencionais técnicas de preservação, em cogumelos *Pleurotus ostreatus* após e durante o armazenamento (21 dias a 4°C). Os cogumelos frescos foram submetidos a um tratamento de 600MPa durante 10 minutos, tendo sido usado como controlo amostras não pressurizadas, embaladas de forma convencional (bandejas de poliestireno envoltos em película de policloreto de vinil). Em todas as amostras foram efectuadas ensaios físico-químicos e determinações microbiológicas. Concluiu-se que a utilização de ácido cítrico não trouxe benefícios relevantes e que a utilização de alta pressão mostrou ser promissora para aumentar o período de vida útil do produto em causa.

Rodrigues (2014) analisou a influência do tratamento de alta pressão (400MPa, 5 minutos) no embalamento a vácuo de carapau seco e estabilidade do produto, após trinta dias de processamento, através de análises físico-químicas (cor, textura, pH, azoto básico volátil total, cinza total, cloreto de sódio e humidade), determinações microbiológicas (contagem de microrganismos a 30°C) e análise sensorial. Os carapaus não processados obtiveram melhores resultados, tendo sido os preferidos, apesar dos valores do ABVT e da contagem de microrganismos a 30°C indicarem que o processo de alta pressão retardou a degradação microbiológica.

3. Metodologias

3.1. Obtenção das amostras

Os bombons recheados foram produzidos nas instalações da empresa Sugar Bloom (Beja, Portugal), tendo sido utilizado chocolate temperado com 51% de cacau para a cobertura (CHD-R515-565, Sicao) e chocolate branco (CDW-U2630-557, Sicao) com natas (33% de gordura), numa proporção de 2: 1, no recheio.

Como é possível visualizar na figura 8, começou por se colocar chocolate preto em moldes de policarbonato (30mm x 30mm x 26mm altura), tendo-se retirado o excesso para formação da camada superior do bombom (Figura 8i e Figura 8i), seguindo-se o seu arrefecimento durante 15 minutos para solidificação do chocolate (Figura 8iii). De seguida, preparou-se o recheio através do aquecimento das natas a 90°C, utilizando uma placa de aquecimento provida com um agitador magnético. Após atingir 90°C, foi adicionado o chocolate branco, utilizando um misturador manual de duas laminas para homogeneizar (Braun Multiquick 5MR500). Deixou-se arrefecer a mistura até aos 30°C, à temperatura ambiente e, com ajuda de um saco de pasteleiro, colocaram-se cerca de 6g de enchimento nas cavidades de chocolate escuro previamente preparadas (Figura 8iv). Após o enchimento, o molde voltou à temperadora para colocação da cobertura final, que corresponde à base do bombom (Figura 8v), seguindo-se o seu arrefecimento durante 15 minutos (Figura 8vi).

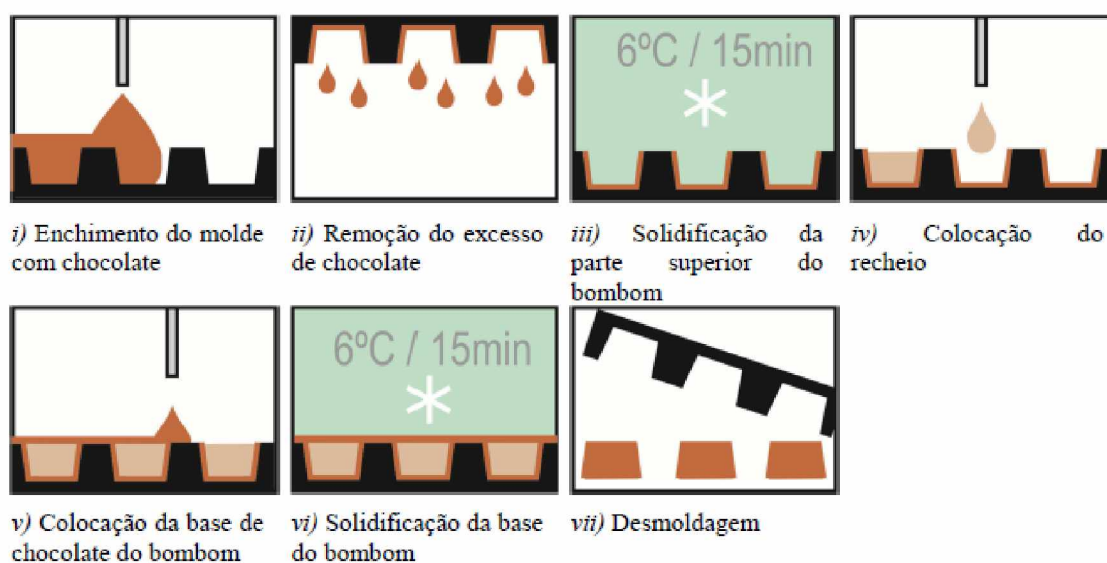


Figura 8: Esquema fabrico dos bombons (Dias, 2014).

Após a desmoldagem (Figura 8vii), os bombons foram mantidos a 25°C por 24h para cristalizar completamente a manteiga de cacau, sendo embalados a vácuo em sacos flexíveis de polietileno (cinco bombons por cada saco) (PA/PE-90, Albipack—Packaging Solutions, Águeda, Portugal).

3.1.1. Tratamento

Depois de embaladas e seladas, as amostras foram submetidas a diferentes condições, originando 4 ensaios diferentes, como possível visualizar na tabela 1.

Tabela 1: Identificação das condições dos ensaios

Ensaio	Tratamento HHP	Temperatura de conservação
0,1MPa/20°C	Sem HHP	20°C
0,1MPa/4°C	Sem HHP	4°C
400MPa/20°C	Alta pressão (400MPa)/2min.	20°C
500MPa/20°C	Alta pressão (500MPa)/1min.	20°C

Nos ensaios onde ocorreu tratamento por HPP (400MPa/20°C e 500MPa/20°C), as amostras foram submetidos a um equipamento de alta pressão de 55litros (Hiperbaric 55, Hiperbaric, Burgos, Espanha), presente no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, tendo um sido sujeito a um ciclo de 400MPa durante 2,5 minutos e outro a 500MPa, durante 1 minuto. De seguida, é possível observar os gráficos de pressão vs. tempo, relativos aos diferentes processos de alta pressão (figura 9), bem como o aspecto da amostra após ser submetida ao processo (figura 10). Posteriormente, estes bombons foram conservados a 20°C.

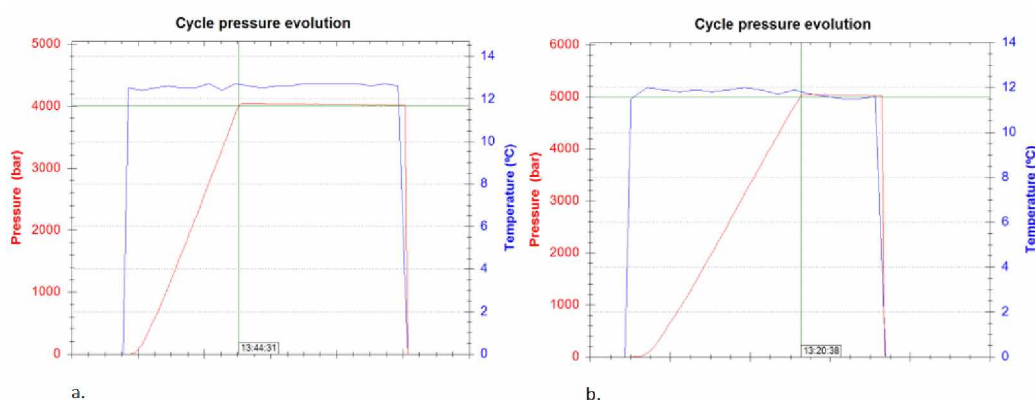


Figura 9: Gráficos de Pressão vs. Tempo, dos tratamentos a 400MPa/20°C (a.) e a 500MPa/20°C (b.).



Figura 10: Aspecto do bombom depois de submetido ao tratamento de alta pressão.

O aparelho de alta pressão (Figura 11) possui um recipiente de pressão, com 200mm de diâmetro interno e um comprimento de 2000mm, atingindo uma pressão máxima de 600MPa. Esta câmara encontra-se ligada a uma unidade de refrigeração (RMA KH 40 LT, Ferroli, San Bonifacio, Itália), de modo a permitir controlar a temperatura da água de entrada, que dá origem à pressurização. A acumulação de pressão ocorreu a uma taxa de compressão de 200MPa por minuto e o aquecimento adiabático provocou um aumento da temperatura em torno de 1°C por cada 100MPa aplicado, enquanto que a descompressão ocorreu instantaneamente.



Figura 11: Equipamento de alta pressão (Hiperbaric 55, Hiperbaric, Burgos, Espanha).

Adicionalmente, foram produzidos outros dois ensaios de conservação, sem qualquer tipo de tratamento por HPP, tendo um sido submetido a conservação em câmara de refrigeração a 4°C (0,1MPa/4°C) e outro submetido a conservação em câmara a 20°C (0,1MPa/20°C). A conservação de todos os ensaios decorreu nas instalações da Escola Superior Agrária durante um período de 6 meses.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Delineamento experimental

Em cada ensaio (Tabela 1) foi realizada uma amostragem mensal, durante o tempo de conservação (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 dias), tendo sido utilizado um total de 150 bombons.

3.2.2. Avaliação química

a. Determinação do pH

O pH foi determinado por potenciometria (Metrohm 104 pH Meter, Suíça), com penetração do eléctrodo directamente no recheio do bombom, a 20 ± 1 °C. Esta determinação foi efectuada em triplicado.

b. Determinação da actividade da água (Aw)

A actividade da água foi determinada através de método higrométrico (Rotronic HydroPalm, Suíça), tendo sido colocada a amostra em caixas adaptadas ao aparelho. Este por sua vez encontrava-se ligado a um banho de água (Grant LTD6, Inglaterra), mantido a 20°C. A leitura de cada amostra foi efectuada após 15 minutos de ter sido colocada no aparelho. Esta determinação foi efectuada em triplicado.

c. Determinação da humidade

A humidade foi determinada de acordo com o método gravimétrico nº 931.04 Official Methods of Analysis (AOAC, 1990). Como tal determinou-se a diferença de massas da amostra, com pesagens realizadas em balança analítica (Mettler Toledo AB 204-S, Suíça), após secagem em estufa (Memmert Modell 400, Alemanha) a 100 ± 1 °C. Esta determinação foi efectuada em triplicado.

3.2.3. Avaliação física

a. Determinação da cor

A avaliação da cor foi feita instrumentalmente, com recurso a um colorímetro Minolta CR-300R (Minolta, Osaka, Japão), a qual usa o sistema de coordenadas CIELAB, definido pela comissão “Commission Internationale de L’Eclairage” – “CIE 1976 L*a*b* Uniform Colour Space”. Foram efectuadas medições à camada exterior do chocolate e ao recheio, em ambas em triplicado.

Através das coordenadas L*, a*, b*, determinou-se o *whiteness index* (WI), com variação entre 0 (menos branco) e 100 (branco), utilizando a seguinte equação (Nopens *et al.*, 2008):

$$WI = 100 - [(100-L)^2 + a^2 + b^2]^{0,5}$$

b. Análise reológica

Foram realizadas medições oscilatórias de pequena amplitude, nos recheios, utilizando um reómetro de deformação controlada (Malvern Kinexus lab +, Inglaterra), ligado a um circuito de refrigeração com temperatura controlada. O comportamento viscoelástico dos recheios foi avaliado a 20 °C ± 1 °C, com a geometria de pratos paralelos de 20 mm e uma distância de abertura de 1 mm.

Avaliou-se a região viscoelástica linear (LVR) realizando um varrimento de deformação (0,001% -1000%), a uma frequência constante de 1 Hz. Finalmente, o varrimento de frequência dinâmica foi conduzida aplicando uma tensão constante de 0,01%, dentro da região viscoelástica linear, de 0,01Hz a 100Hz. Os parâmetros reológicos deste estudo foram os módulos de armazenamento (G', em Pa) e de perda (G'', em Pa).

3.2.4. Análises microbiológicas

a. Preparação da amostra e das diluições

Em condições de assepsia, com o auxílio de um bisturi e de pinças esterilizadas, foram pesados 10 g de amostra (Mettler Toledo PB1501-S, Suíça) para um saco adequado ao

Stomacher, ao qual se adicionou 90 mL de solução de Ringer, previamente preparada. De seguida efectuou-se homogeneização em aparelho Stomacher (Stomacher 400 Circulator, Reino Unido), durante dois minutos e trinta segundos. Em cada tubo de ensaio esterilizado colocaram-se 9mL de solução de Ringer e 1mL da diluição anterior, devidamente homogeneizada (Heidolph REAX 2000, Alemanha).

b. Contagem de Mésofilos totais

Os microrganismos totais a 30°C foram determinados de acordo com a norma NP4405:2002, tendo sido pipetado, com uma pipeta esterilizada, 1 mL de cada diluição para as respectivas placas de Petri estéreis. De seguida, foi adicionado meio Plate Count Agar (PCA), fundido e arrefecido a 45°C, a cada uma das placas de Petri. Logo de seguida foi feita homogeneização com o inóculo, através de movimentos suaves, rotativos e perpendiculares, e deixou-se solidificar. A incubação (Memmert, Alemanha) decorreu a 30°C durante 72horas, com as placas invertidas. Terminado o período de incubação procedeu-se à contagem de todas as colónias presentes em cada placa de Petri de duas diluições sucessivas que contivessem entre 15 e 300 colónias e o número de microrganismos por grama (N) calculou-se segundo a seguinte formula:

$$N = \frac{\sum c}{(n1+0,1n2) \times d}$$

Onde:

$\sum c$ - Soma das colónias características contadas em todas as placas das diluições escolhidas-

$n1$ - Número de placas contadas na primeira diluição.

$n2$ - Número de placas contadas na segunda diluição

d - Factor de diluição a partir da qual se efectuaram as primeiras contagens.

Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (UFC/g).

Na preparação do meio Plate Count Agar (PCA) dissolveram-se 17,5 gramas de meio desidratado (Oxoid CM325) em cada litro de água destilada, tendo-se colocado em banho

fervente, para dissolução completa. De seguida esterilizaram-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

c. Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi efectuada de acordo com a norma NP3277-1:1987, onde 0,2mL de cada diluição foram pipetados através de pipetas esterilizadas para as placas estéreis correspondentes, já com meio de cultura Rose Bengal Chloramphénicol sólido, preparado previamente. O meio Rose Bengal Chloramphenicol foi preparado dissolvendo-se 16 gramas de meio desidratado (Oxoid CM0549) em 500mL de água destilada, tendo-se colocado em banho, para dissolução completa. De seguida adicionou-se suplemento de Chloramphenicol (Oxoid SR0078E), preparado de acordo com as instruções do fabricante, onde se adicionou 3mL de suplemento por cada 500mL de meio Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base. Por fim, esterilizou-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente foi feito o espalhamento do inoculo sobre o meio de cultura, com auxilio de um espalhador de vidro esterilizado. A incubação (Mettler, Germany) foi feita 25°C± 1 °C durante 5 dias, com ensaios realizados em quintuplicado para cada amostra. De seguida foi feita a contagem de bolores e leveduras em separado, nas placas da mais baixa diluição, cujo o numero de colónias por placa seja inferior a 300.

Para obter a contagem total, primeiro multiplicou-se a soma do número de colónias de cada tipo de microorganismo nas 5 placas, pelo inverso do factor da diluição em que foi efectuada a respectiva contagem de forma a obter o teor total de bolores e de leveduras por grama de amostra. Só depois de efectuou a multiplicação da soma no numero de colonias dos dois tipos de microorganismos nas cinco placas, pelo inverso do factor de diluição que foi efectuada a contagem de modo a obter o teor total de fungos. O teor total de fungos por grama de produto obteve-se através da seguinte formula:

$$(n+n') \times d$$

Onde:

n: soma do numero de colónias de bolores contadas nas 5 placas da suspensão-mãe ou da diluição considerada.

n': soma do numero de colónias de leveduras contadas nas 5 placas da suspensão-mãe ou da diluição considerada.

d: denominador da diluição em relação à qual se efetuou a contagem.

3.2.5. Estatística descritiva e análise de variância

Foram determinados a média, desvio padrão e intervalo de confiança de 0,95. Para análise estatística, os dados foram submetidos ao teste unidirecional Anova (comparação de médias com teste Scheffé), os coeficientes de correlação de Pearson (r) foram calculados entre os parâmetros avaliados e tempo de armazenamento, usando o nível de significância ($P < 0,05$). O software utilizado foi o Statistic 6.0 (StatSoft Inc., EUA).

4. Resultados e discussão

4.1. Parâmetros químicos

O valor de humidade inicial foi de 25%, resultado do maior teor de natas utilizado na formulação adoptada, quando comparado com formulação tradicional, sendo inferior ao encontrado em recheios com reduzido teor de gordura (Dias *et al.*, 2015).

Como é possível reparar através da figura 12, durante o tempo de armazenamento houve descida significativa ($P < 0,05$) do teor de humidade, em todas as condições testadas, em especial a 20°C. Os bombons sujeitos a refrigeração (4°C) apresentaram maior conteúdo em humidade (20,0%), seguindo-se o testemunho a 20°C (18,3%), o tratamento a 500MPa/20°C (17,9%) e por fim o tratamento a 400MPa/20°C (16,6%), apresentando todos os ensaios coeficientes de correlação de Pearson negativos (tabela A.1 em anexo).

No caso dos ensaios sujeitos a alta pressão (400MPa e 500MPa) esta perda também pode estar associada ao facto de os bombons apresentarem algumas fissuras, facilitando a perda de água para o exterior.

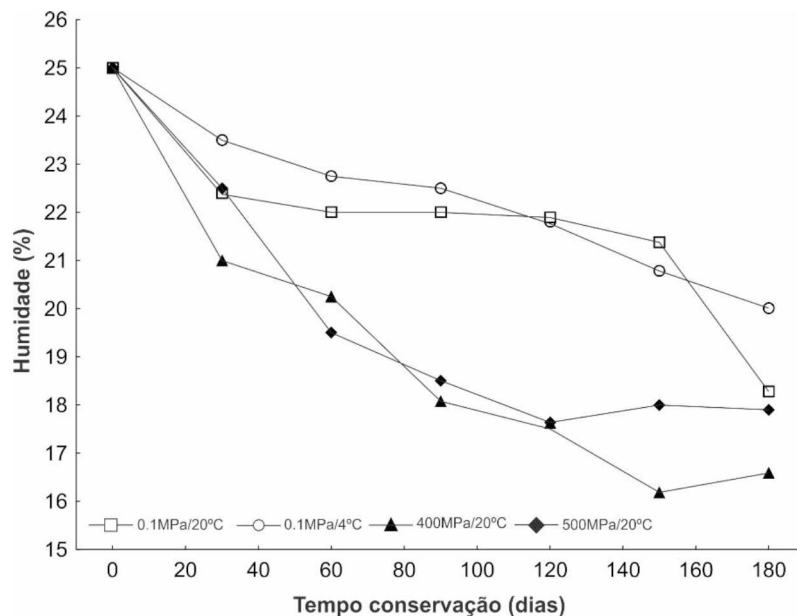


Figura 12: Evolução da humidade

Relativamente à actividade da água (A_w), observou-se um valor inicial de 0,84 seguido de uma diminuição em todos os ensaios (Figura 13), confirmado pelo coeficiente de Pearson (tabela A.1 em anexo). Aos 180 dias, o ensaio a 4°C apresentou valor A_w de 0,71, seguindo-se o ensaio testemunho (20°C) e a 500MPa/20°C com

0,70 e por fim o ensaio a 400MPa/20°C com 0,68, havendo diferenças significativas entre eles ($P < 0.05$).

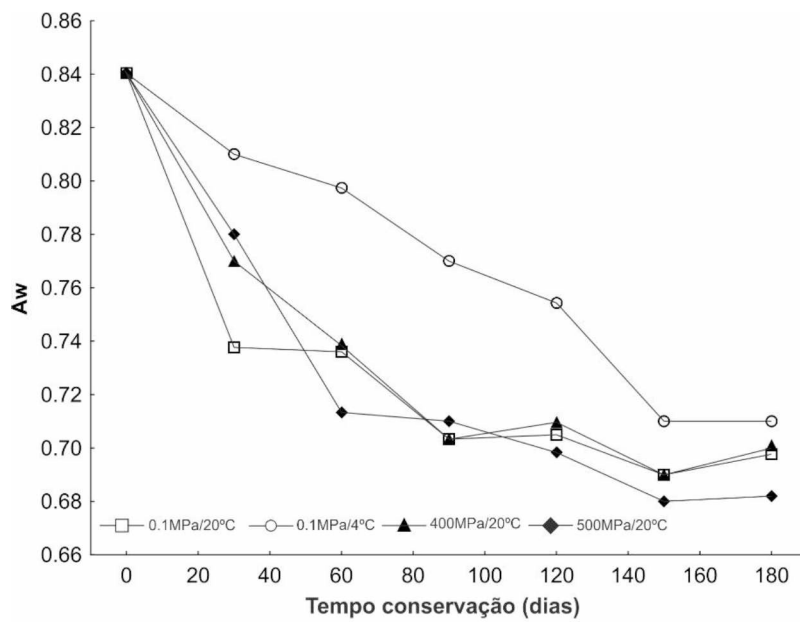


Figura 13: Evolução da actividade da água (A_w)

O valor de pH inicial foi de 6,1 (Figura 14), semelhante a estudos efectuados em recheios de bombons (Dias *et al.*, 2015). A evolução do pH apresentou uma diminuição do valor com o decorrer do tempo de conservação em todos os ensaios, confirmado pela correlação de Pearson ($P < 0.05$). O ensaio 0.1MPa/4°C apresentou um valor final de 5,6, seguindo-se o testemunho (0.1MPa/20°C), o tratamento 400MPa/20°C e por fim o tratamento 500MPa/20°C com 5,2.

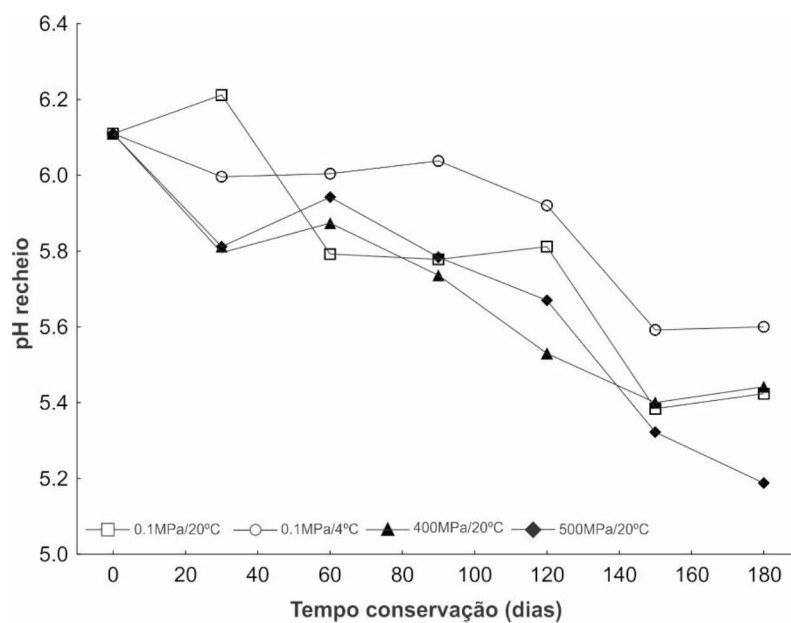


Figura 14: Evolução do pH

4.2. Análise Física

4.2.1. Cor

O valor do *whiteness index* (WI) inicial da cobertura dos bombons foi de 34,06, idêntico ao verificado noutros estudos em chocolate (Briones & Aguilera, 2005; Briones *et al.*, 2006; Popov-Raljić & Laličić-Petronijević, 2009). Através da figura 15 é possível verificar que se verificou um aumento do WI em todos os ensaios, para valores de 45,89 (500MPa / 20°C e 0.1MPa/20°C), 45,67 (0.1MPa/4°C) e 45,27 (400MPa / 20°C), com coeficientes de correlação de Pearson positivos (tabela A.1 em anexo) e sem diferenças significativas entre os ensaios com e sem tratamento de alta pressão ($P > 0,05$). Estes resultados evidenciam que a superfície do chocolate passou de um tom escuro para branco—acinzentado durante a conservação, defeito denominado *fat bloom* e resultante de alterações na forma dos cristais de gordura, possivelmente resultante de oscilações de temperatura durante o armazenamento (Sonwai & Rousseau, 2008).

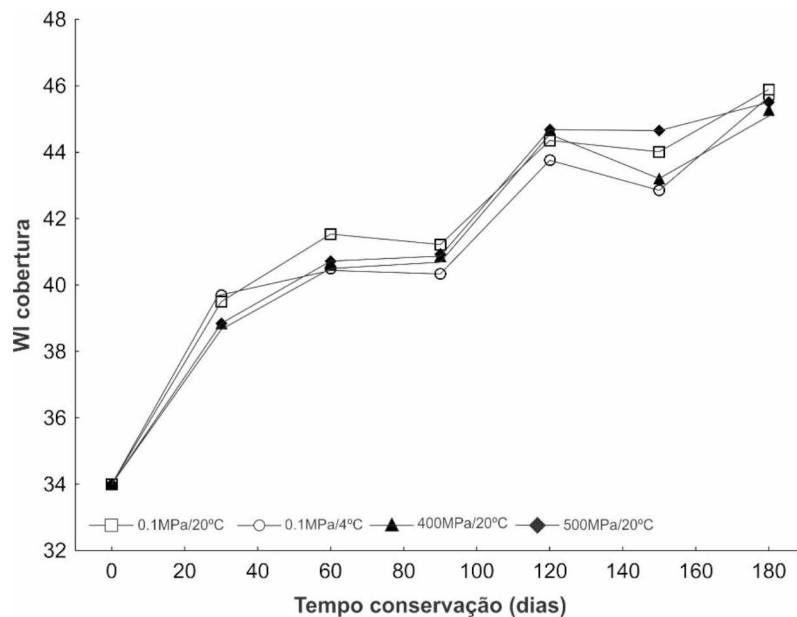


Figura 15: Evolução do *whiteness index* do chocolate de cobertura

No recheio (figura 16), o WI inicial foi de 73,12, semelhante ao obtido noutros estudos efectuados em recheios de chocolate branco e azeite virgem (Dias *et al.*, 2016). Com o decorrer do tempo de armazenamento, este valor foi diminuindo, em todos os ensaios, resultado da difusão dos sólidos do cacau desde a cobertura ao recheio de

chocolate branco, tendo-se observado a existência de diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os vários ensaios.

No testemunho (0,1MPa/20°C) e no tratamento de 500MPa/20°C, esta redução foi maior (63,11 e 62,67) do que no ensaio com conservação a baixa temperatura 0.1MPa/4°C e no tratamento a 400MPa/20°C (67,38 e 66,18), o que poderá estar relacionado com o facto de o tratamento de alta pressão induzir desintegração de micelas, alterando a cor de branco para amarelado (Chawla *et al.*, 2011). Este fenómeno não se observou no outro tratamento, possivelmente pelo facto de se terem utilizado níveis de pressão mais baixos. Essas duas evoluções diferentes podem ser confirmadas através dos coeficientes negativos de correlação de Pearson (Tabela A.1 em anexo).

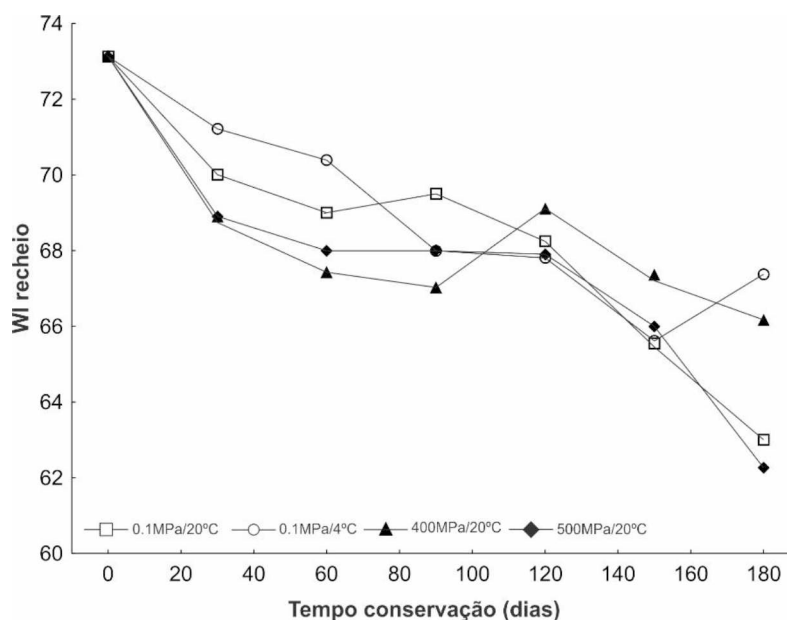


Figura 16: Evolução do *whiteness index* do recheio

4.2.2. Análise reológica

O valor inicial de G' , do recheio dos bombons, foi de $13,7 \times 10^4$ Pa (figura 17), o qual aumentou em todos os ensaios, no decorrer do tempo de armazenamento, com diferenças significativas entre si ($P < 0,05$). Após os 180 dias, as amostras refrigeradas a 4°C apresentaram menor módulo de armazenamento ($81,3 \times 10^4$ Pa), seguido do testemunho a 20°C ($540,0 \times 10^4$ Pa), do tratamento a 400MPa/20°C ($696,6 \times 10^4$ Pa) e por fim a 500MPa/20°C ($721,0 \times 10^4$ Pa). Uma das possíveis causas para este efeito

está relacionado com o facto de a tecnologia de alta pressão provocar desintegração das micelas de caseína, do leite, em partículas de menores dimensões (Penna *et al.*, 2007), estrutura da proteína agregada e cristalização de gordura induzida (Chawla *et al.*, 2011).

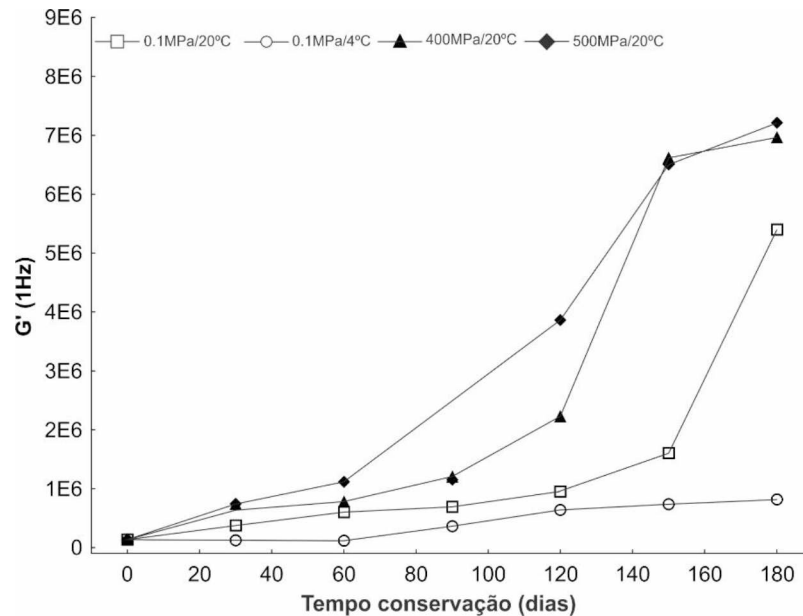


Figura 17: Evolução módulo elástico (G')

4.3. Análise microbiológica

O efeito do HHP sobre o desenvolvimento microbiano dos bombons foi avaliado através da medição dos mesófilos aeróbios totais (Figura 18) e dos bolores e leveduras (Figura 19), durante o tempo de armazenamento. A carga microbiana inicial dos bombons foi de $4,06 \log_{10}$ ufc/g em mesófilos e de $1,78 \log_{10}$ ufc/g para bolores e leveduras, idêntico a outros estudos efectuados em pralinés com recheios à base de gordura (Marvig *et al.*, 2014). Esta carga inicial pode estar na origem de uma possível contaminação por chocolate ou do próprio ambiente da fábrica (Marvig *et al.*, 2014; De Clerq *et al.*, 2015). Noutros estudos, observou-se que as contaminações eram dominadas por leveduras (*Zygosaccharomyces rouxii*), seguidas de bolores (*Penicillium spp.* e *Aspergillus spp.*) e bactérias (*Bacillus spp.* e *Staphylococcus spp.*) (Marvig *et al.*, 2014).

Dos zero aos 180 dias, no ensaio refrigerado a 4°C, verificou-se a redução ao nível dos mesófilos ($2,71 \log_{10}$ ufc/g), associado ao facto de este ter sido mantido a temperaturas abaixo do ponto óptimo deste tipo de microrganismos (30°C). Quanto aos bolores e

leveduras, houve desenvolvimento, pois toleram temperaturas baixas, no entanto pouco acentuado ($2,54 \log_{10} \text{ ufc/g}$).

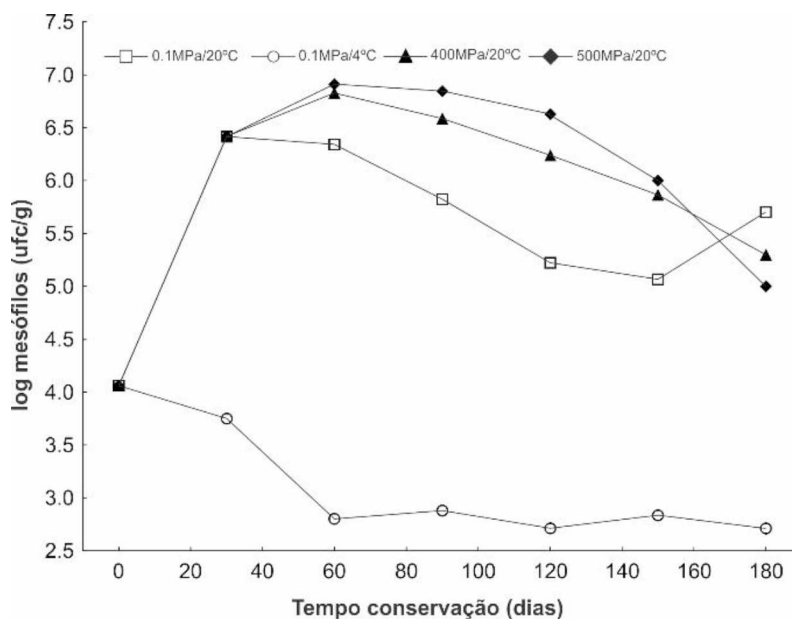


Figura 18: Evolução dos mesófilos totais

Relativamente aos outros ensaios, observou-se um coeficiente de correlação de Pearson positivo (Tabela A.1 em anexo) entre os mesófilos totais e o tempo de armazenamento até aos 60 dias, incluindo o tratamento a 400 MPa / 20°C ($6,83 \log_{10} \text{ ufc/g}$) e 500 MPa / 20°C ($6,91 \log_{10} \text{ ufc/g}$). Este fato pode ser devido à capacidade de alguns microrganismos sobreviverem ao tratamento de alta pressão, especialmente as bactérias, em meios nutricionalmente ricos, como é o caso de hidratos de carbono e proteínas em emulsões alimentícias (Hugas et al, 2002). Após o pico aos 60 dias, as amostras apresentaram uma redução nos mesófilos totais até 180 dias, associada ao contínuo esgotamento de nutrientes disponíveis e diminuição do A_w , para $5,00 \log_{10} \text{ ufc/g}$ no estudo a 500MPa, $5,31 \log_{10} \text{ ufc/g}$ a 400MPa e $5,70 \text{ ufc/g}$ no testemunho (20°C). Já no caso dos bolores e leveduras, verificou-se um aumento progressivo, para $4,26 \log_{10} \text{ ufc/g}$ no ensaio 500MPa/20°C, $5,08 \log_{10} \text{ ufc/g}$ no tratamento a 400MPa e $5,38$ no testemunho, concluindo-se que o tratamento de alta pressão tem influência ao nível do desenvolvimento microbiológico, quando comparado com o testemunho, sendo tanto mais eficaz quanto maior o nível de pressão aplicada.

Assim sendo, durante o armazenamento, nos estágios iniciais, a contaminação por fungos e leveduras representou cerca de 40%, relativamente aos do mesófilos totais.

Posteriormente, esse valor aumentou para mais de 85%. Este crescimento pode ser devido à maior tolerância dos bolores e leveduras a baixo A_w , pH e teor de humidade.

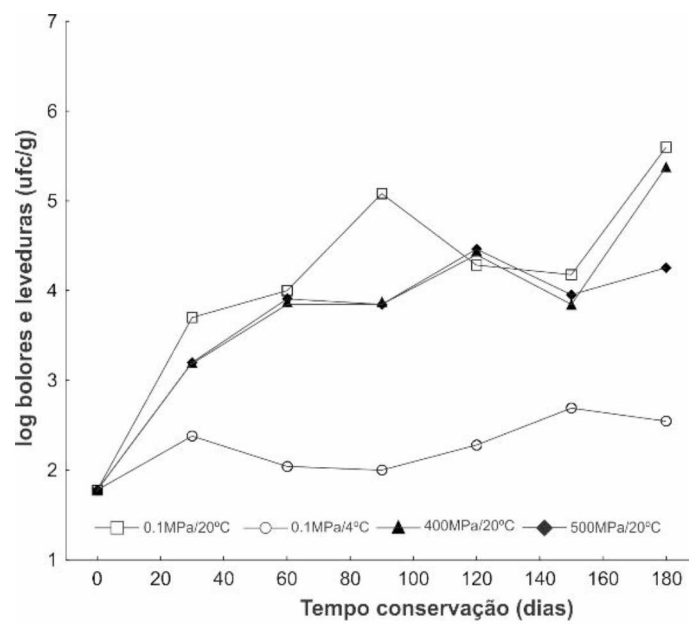


Figura 19: Evolução dos bolores e leveduras

5. Conclusão

Neste trabalho, o objectivo foi estudar o efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática, em bombons, assim como perceber qual o binómio pressão-temperatura mais adequado ao produto em causa. O estudo implicou a monitorização das propriedades físico-químicas, reológicas e microbiológicas, ao longo do tempo de conservação e a manutenção das variáveis envolvidas no processo de produção e conservação: i) seleção do tipo de tratamento (alta pressão, refrigeração ou testemunho); ii) seleção dos ciclos de tratamento (400MPa/2,5minutos ou 500MPa/1minuto); iii) temperatura de conservação (20 °C, ou 4 °C); iv) tempo de conservação (dos 0 aos 180dias).

A humidade e A_w apresentaram um comportamento idêntico durante a conservação. O ensaio a 0.1MPa/4°C mostrou ter maior conteúdo em humidade e A_w (20% e 0,71), seguido do ensaio 0.1MPa/ 20°C (18,3% e 0,70), do ensaio 500MPa/20°C (17,9% e 0,70) e por fim o ensaio 400MPa/20°C (16,6% e 0,68). Esta relação está associada ao facto de a humidade representar a quantidade de água total do alimento, ou seja, água livre (A_w) e água ligada. Relativamente ao pH (6,1), após o tempo de armazenamento, pouco desceu, para valores relativamente próximos em todos os ensaios, onde o ensaio a 4°C apresentou um valor de 5,8, seguindo-se o tratamento a 400MPa/20°C com 5,4 e o testemunho e tratamento a 500MPa/20°C com 5,2.

A análise de cor foi avaliada através do *whiteness index* (WI). Na cobertura (34,06) após os 180 dias, os ensaios apresentaram valores idênticos. Contudo houve menor descida no tratamento a 400MPa/20°C (45,27), seguindo-se a amostra a 4°C (45,67), o tratamento a 500MPa/20°C e testemunho (45,89). No recheio, aos 0 dias o WI era de 73,12, o qual desceu menos nos bombons mantidos a 4°C (67,38) e no tratamento a 400MPa/20°C (66,18). No testemunho e tratamento a 500MPa/20°C a descida foi mais acentuada (63,11 e 62,67, respectivamente). Este fenómeno está relacionado com a difusão de sólidos da cobertura para o recheio e no caso do tratamento de alta pressão.

O valor inicial do módulo de armazenamento (G') do recheio dos bombons foi de $13,7 \times 10^4$ Pa e aumentou em todos os ensaios, no decorrer do tempo de armazenamento. Ao fim dos 180 dias, as amostras refrigeradas a 4°C apresentaram menor módulo de armazenamento ($81,3 \times 10^4$ Pa), seguido do testemunho a 20°C ($540,0 \times 10^4$ Pa), do

tratamento a 400MPa/20°C ($696,6 \times 10^4$ Pa) e por fim a 500MPa/20°C ($721,0 \times 10^4$ Pa), o que representa um maior endurecimento do recheio durante a conservação.

Na análise microbiológica, mesófilos totais e bolores e leveduras, cuja carga inicial de $4,06 \log_{10}$ ufc/g e $1,78 \log_{10}$ ufc/g, sofreram aumento até 180 dias, com exceção da amostra mantida a 4°C, onde se verificou diminuição ao nível dos mesófilos totais ($2,71 \log_{10}$ ufc/g), pelo facto de esta temperatura inibir o seu desenvolvimento. Nos bombons armazenados a 20°C, verificou-se um aumento de mesófilos, com um pico aos 60 dias, em que o tratamento a 500MPa apresentou $6,91 \log_{10}$ ufc/g, a 400MPa $6,83 \log_{10}$ ufc/g e o testemunho uma carga de $6,34 \log_{10}$ ufc/g, seguido de diminuição, até aos 180 dias, para $5,00 \log_{10}$ ufc/g, $5,31 \log_{10}$ ufc/g e $5,70 \log_{10}$ ufc/g, respectivamente. Este fato está associado à capacidade de alguns microrganismos sobreviverem ao tratamento de alta pressão, sobretudo em meios nutricionalmente ricos, sendo a descida após os 60 dias resultado do esgotamento de nutrientes disponíveis e descida de Aw. Quanto aos bolores e leveduras, o ensaio a 4°C apresentou menor carga microbiana ($2,54 \log_{10}$ ufc/g) e os tratamentos sujeitos a alta pressão, 500MPa e 400MPa, melhores resultados que o testemunho ($4,26 \log_{10}$ ufc/g, $5,08 \log_{10}$ ufc/g e $5,38 \log_{10}$ ufc/g, respectivamente), evidenciando que a alta pressão tem influencia ao nível do desenvolvimento microbiano, quando comparado com o testemunho que não sofreu qualquer tipo de tratamento e que foi mantido à mesma temperatura dos restantes (20°C).

Podemos concluir que, na globalidade, o ensaio que melhor manteve as características originais do produto foi o 0.1MPa/4°C. Relativamente aqueles que sofreram tratamento de alta pressão, o ensaio a 400MPa foi o mais negativo relativamente à humidade e o ensaio a 500MPa o menos eficaz ao nível do Aw, pH, cor e modulo de armazenamento (G'). Contudo, foi o mais eficiente em termos microbianos.

As pressões identificadas no presente estudo estiveram limitadas pela resistência mecânica do chocolate de cobertura, o qual não tolera pressões muito altas. Seria importante aprofundar o presente estudo recorrendo apenas ao embalamento do recheio para que torne possível utilizar tratamentos mais intensos e, possivelmente, mais eficazes.

6. Referências bibliográficas

AOAC (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15^a Ed, Washington.

Aymerich, T.; Picouet, P.; Monfort, J. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science* **78**:114-129.

Barbosa-Cánovas, G. ; Pothakamury, U. R.; Palou, E.; Swanson, B. (1998). *Nonthermal Preservation of Foods*. Marcel Dekker, Inc, New York.

Briones, V. & Aguilera, J. (2005). Image analysis of changes in surface color of chocolate. *Food Research International*, *38*, 87–94.

Briones, V., Aguilera, J. & Brown, C. (2006). Effect of surface topography on color and gloss of chocolate samples. *Journal of Food Engineering*, *77* (4), 776–783.

Casadei, M.; Mackey, B. (1999). Use of a Fatty Acid Auxotroph To Study the Role of Membrane Fatty Acid Composition on the Pressure Resistance of Escherichia coli. In H. Ludwig (Ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*. Springer, Heidelberg.

Chawla, R. ; Patil, G. R.; Singh, A. K. (2011). High hydrostatic pressure technology in dairy processing: review. *Journal Food Scientists & Technologists* **48**: 260-268

Cheftel, J. C. (1995). Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International* **1**: 75-90.

Cheftel, J.; Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science* **46**: 211-236.

Clariana, M.; Guerrero, L.; Sárraga, C.; Díaz,I.; Valero, A.; García-Regueiro, J.(2011). Influence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. Effects along the storage period. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **12**: 456-465.

De Clercq, N., Van Coillie, E., Van Pamel, E., De Meulenaer, B., Devlieghere, F. & Vlaemynck, G. (2015). Detection and identification of xerophilic fungi in Belgian chocolate confectionery factories. *Food Microbiology*, 46, 322-328.

Dias, J. J. (2014). *Optimização da produção e conservação de bombons artesanais de baixo valor calórico*. Tese para obtenção do grau de doutor em engenharia alimentar. Instituto superior de agronomia – Universidade de Lisboa. Lisboa.

Dias, J., Almeida, M., Adikevičius, D., Andzevičius, P. & Alvarenga, N. (2016). Impact of olive oil usage on physical properties of chocolate fillings. *Grasas y Aceites*, 67 (3), e145.

Dias, J., Alvarenga, N., Sousa, I. (2015). Effect of hydrocolloids on low-fat chocolate fillings. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (11), 7209-7217.

Diez, A.; Santos, E.; Jaime, I; Rovira, J. (2008). Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage. *Food Microbiology* 25: 154-161.

Farr, D. (1990). High pressure technology in food industry. *Trends in Food Science and Technology*.

Ferreira, J. M. R. (2011). *Efeito do Tratamento por Alta Pressão na Sorção de Água pelo Amido*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia – Ramo alimentar. Departamento de Química – Universidade de Aveiro, Aveiro.

Garriga, M.; Aymerich, M.; Costa, S.; Monfort, J.; Hugas, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology* 19: 509-518.

Garriga, M.; Grèbol, N.; Aymerich, M. T.; Monfort, J.; Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5: 451– 457.

Herrero, A. M.; Avila, M. D. R. (2006). Innovaciones en el processado de alimentos: tecnologías no térmicas. *Revista de medicina de la Universidad de Navarra* 50: 71-74.

Hugas, M.; Garriga, M.; Monfort, J. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science* **62**: 359-371.

Jofré, A.; Aymerich, T.; Bover-Cid, S.; Garriga, M. (2010). Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. *International Microbiology* **13**: 105-112.

Jung, S.; Samson, C. T.; Lamballerie, M. (2011). High hydrostatic pressure food processing. In A. Proctor (Ed.), *Alternatives to Conventional Food Processing*. (pp. 254-306). RSC Publishing.

Lau, M. H.; Turek, E. J. (2007). Determination of quality differences in low-acid foods sterilized by high pressure versus retorting. In C. J. Doona & F. E. Feeherry (Eds.), *High Pressure Processing of Foods* (pp. 195-217). Wiley-Blackwell, Oxford.

López-Caballero, M.; Carballo, J.; Solas, M.; Jiménez-Colmenero, F. (2002). Responses of *Pseudomonas fluorescens* to combined high pressure/temperature treatments. *European Food Research and Technology* **214**: 511-515.

Madeira, A. F. P. (2013). *Pectinases e Alta Pressão. Aplicação ao Controlo de Qualidade dos Sumos*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Faculdade de Farmácia – Universidade de Lisboa, Lisboa.

Martins, C. F. (2014). *Efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática nas características microbiológicas e físicas da tripa natural de suíno*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa. Lisboa

Marvig, C., Kristiansen, R., Madsen, M., & Nielsen, D. (2014). Identification and characterisation of organisms associated with chocolate pralines and sugar syrups used for their production. *International Journal of Food Microbiology*, **185**, 167-176.

Mendonça, J. M. (2012). *Aplicação da tecnologia de alta pressão na conservação de um produto cárneo transformado em Portugal*. Dissertação para obtenção de grau de

mestre em segurança alimentar. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa. Lisboa

Nopens, I.; Foubert, I.; De Graef, V. ; Van Laere, D.; Dewettinck, K.; Vanrolleghem, P. (2008). Automated image analysis tool for migration fat bloom evaluation of chocolate coated food products. *Food Science and Technology* **41**: 1884-1891.

Norton, T.; Sun, D. (2008). Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. *Food and Bioprocess Technology* **1**: 2-34.

NP 3277-1 (1987). Norma Portuguesa para contagem de bolores e leveduras. Instituto Português da Qualidade, Ministério da Industria e Energia. Lisboa.

NP 4405 (2002). Norma Portuguesa para contagem de microrganismos a 30°C. Instituto Português da Qualidade, Ministério da Industria e Energia. Lisboa.

Oey, I.; Lille, M.; Loey, A.; Hendrickx, M. (2008). Effect of high- pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food & Science Technology* **19**: 320-328.

Palou, E.; Lopez-Malo, A.; Barbosa-Cánovas, G.; Swanson, B. (2007). High-pressure treatment in food preservation. In M. S. Rahman (Ed.), *Handbook of Food Preservation*. 2ªEd. CRC Press, Boca Raton.

Patterson, M. (1999). High pressure treatment of foods. Academic Press: Belfast.

Patterson, M. F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 1400-1409.

Patterson, M. F.; Ledward, D. A.; Rogers, N. (2006). High pressure processing. In James G. Brennan (Ed), *Food processing Handbook* (pp.173-196). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Penna, A., Subbarao-Gurram & Barbosa-Cánovas, G. (2007). High hydrostatic pressure processing on microstructure of probiotic low-fat yogurt. *Food Research International*, **40**, 510–519.

Popov-Raljić, J. & Laličić-Petronijević, J. (2009). Sensory properties and color measurements of dietary chocolates with different compositions during storage for up to 360 days. *Sensors*, 9, 1996-2016.

Ramaswamy, R.; Balasubramaniam, V.; Kaletunç, G. (2004). High pressure processing. Fact Sheet for food processors. *FactSheet Extension – Food Science and technology*.

Rebello, A. S. A. (2014). *Efeito das altas pressões nas características nutricionais, sensoriais e microbiológicas de um produto de salsicharia*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Castelo Branco. Castelo Branco.

Regulamento (CE) n° 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Janeiro de 1997 relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares.

Rendueles, E.; Omer, M. K.; Alvseike, O.; Alonso-Calleja, C.; Capita, R.; Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. *LWT – Food Science and Technology* **44**: 1251-1260.

Rivalain, N.; Roquain, J.; Demazeau, G. (2010). Development of High Hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect biological structures and potential applications in Biotechnologies. *Biotechnology Advances*. **28**: 659-672.

Rodrigues, V. (2014). *Influência da embalagem a vácuo e do processamento a alta pressão na estabilidade do carapau seco*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre na área de Tecnologia Alimentar. Escola Superior Agrária de Santarém - Instituto Politécnico de Santarém. Santarém.

Rosendo, E. C. F. G. (2014). *Contributo para o estudo da aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática na conservação do cogumelo *Pleurotus ostreatus**. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária de Bragança– Instituto Politécnico de Bragança. Bragança.

Salavessa, J. J. S. M. (2009). *Caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos*. Dissertação de doutoramento apresentada à faculdade de

medicina veterinária da universidade técnica de lisboa. Faculdade de medicina veterinária. Universidade técnica de lisboa. Lisboa.

Sangronis, E.; Pothakamury, U.; Ramos, A. M.; Ibarz, A.; Barbosa-Cánovas, G.; Swanson, B. (1997). La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento térmico de alimentos. *Alimentaria – Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos* **283**: 33- 43.

Setlow, P. (2008). Effects of high pressure on Bacterial Spores. In C. Michiels, D. H. Bartlett, A. Aertsen (Eds.), *High-Pressure Microbiology* (35-52). ASM Press, Washington DC.

Shigehisa, T.; Ohmori, T.; Saito, A.; Taji, S.; Hayashi, R. (1991). Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology* **12**: 207-216.

Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology* **9**: 152-158.

Sonwai, S., Rousseau, D. (2008). Fat Crystal Growth and Microstructural Evolution in Industrial Milk Chocolate. *Crystal Growth & Design*, 8 (9):3165-3174.

Szerman, N.; Barrio, Y.; Schroeder, B.; Martinez, P.; Sancho, A. M.; Sanow, C.; Vaudagna, S. R. (2011). Effect of high hydrostatic pressure treatments on physicochemical properties, microbial quality and sensory attributes of beef carpaccio. *Procedia Food Science* **1**: 854-861.

Téllez-Luis, S. J.; Ramirez, J. A.; Pérez-Lamela, C.; Vázquez, M.; Simal-Gándara, J. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* **3**: 66-80.

Wells-Bennik, M.; Karatzas, K.; Moezelaar, R.; Abee, T. (2008). *Listeria monocytogenes* High Hydrostatic Pressure Resistance and Survival Strategies. In C. Michiels, D. H. Bartlett, A. Aertsen (Eds.), *High-Pressure Microbiology* (101-115). ASM Press, Washington DC.

Yordanov, D. G.; Angelova, G. V. (2010). High pressure processing for foods preserving. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **24** : 1940-1945.

Yuste, J.; Capellas, M.; Pla, R.; Fung, D. Y. C.; Mor-Mur, M. (2001). High pressure processing for food safety and preservation: review. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* **9** : 1-10.

Anexos

Tabela A.1: Coeficiente de correlação de Pearson (r) com o tempo de armazenamento (n=6).

Parâmetros	Tratamento alta pressão/Temperatura armazenamento			
	0.1MPa/4°C	0.1MPa/20°C	400MPa/20°C	500 MPa/20°C
Humidade	-0,95*	-0,64*	-0,85*	-0,79*
Aw	-0,94*	-0,77*	-0,86*	-0,85*
WI cobertura	0,92*	0,87*	0,88*	0,96*
pH	-0,82*	-0,79*	-0,91*	-0,92*
WI Interior	-0,78*	-0,81*	-0,82*	-0,82*
G' (1Hz)	0,75*	0,77*	0,87*	0,82*
Mesofilos totais	-0,78*	-0,40*	-0,26	-0,16
Bolores e leveduras	0,71*	0,46*	0,66*	0,68*

(*) Correlações significativas (P <0,05).

Tabela A.2: Média, desvio padrão e resultados do teste de Scheffé dos vários ensaios, ao longo do tempo de armazenamento a 20°C

Tempo Armazenamento (d)	Condição	Humidade (%)	Aw	WI _{ext}	pH	WI _{int}	G' (1Hz) (Pa)	Mesófilos totais (log UFC/g)	Bolores e leveduras (log UFC/g)
0		25.0(0,00) ^a	0.84(0,00) ^a	34.06(0,02) ^h	6.1(0,03) ^{ab}	73.12(0,42) ^a	1.4x10 ⁵ (4,2x10 ⁴) ^{ei}	4.06(0,00) ^j	1.78(0,04) ^j
30	4°C	23.5(0,50) ^{ab}	0.81(0,02) ^{ab}	39.69(0,23) ^{fg}	6.0(0,08) ^{abc}	71.22(1,00) ^{ab}	1.2x10 ⁵ (3,1x10 ⁴) ^e	3.75(0,00) ^j	2.38(0,01) ^{hij}
30	20°C	22.4(0,21) ^{abc}	0.74(0,00) ^{bcde}	39.52(0,57) ^{fg}	6.2(0,43) ^a	70.01(0,93) ^{abcd}	3.7x10 ⁵ (7,7x10 ⁴) ^e	6.42(0,00) ^{bcd}	3.70(0,55) ^{ef}
30	400MPa/2' 30"	21.0(1,00) ^{abcde}	0.78(0,01) ^{abcde}	38.85(0,34) ^g	5.8(0,08) ^{abcdef}	68.91(0,65) ^{abcd}	7.4x10 ⁵ (4,3x10 ⁵) ^{de}	6.42(0,00) ^{bcd}	3.20(0,02) ^{fg}
30	500MPa/1'	22.6(1,14) ^{abc}	0.78(0,02) ^{abcd}	38.88(0,50) ^g	5.9(0,10) ^{abcde}	68.97(0,51) ^{abcd}	7.4x10 ⁴ (7,7x10 ⁴) ^{de}	6.42(0,00) ^{cde}	3.20(0,09) ^{ghij}
60	4°C	22.8(0,50) ^{abc}	0.80(0,01) ^{abc}	40.52(0,47) ^{efg}	6.0(0,04) ^{abc}	70.39(0,59) ^{abc}	1.2x10 ⁵ (2,8x10 ⁴) ^e	2.80(0,16) ^k	2.04(0,00) ^{hijf}
60	20°C	21.8(1,48) ^{abcd}	0.74(0,00) ^{bcde}	41.53(1,36) ^{efg}	5.8(0,13) ^{abcdef}	68.81(1,39) ^{abcd}	6.0x10 ⁵ (1,1x10 ⁵) ^e	6.34(0,04) ^{bcde}	4.03(0,12) ^{de}
60	400MPa/2'30"	20.8(1,50) ^{bcdef}	0.74(0,03) ^{abcde}	40.62(0,44) ^{defg}	5.9(0,08) ^{abcde}	67.43(0,94) ^{bcde}	7.8x10 ⁵ (2,2x10 ⁵) ^{de}	6.83(0,06) ^{abc}	3.88(0,01) ^{def}
60	500MPa/1'	19.5(2,52) ^{bcdef}	0.71(0,02) ^{cde}	40.72(0,36) ^{defg}	5.9(0,04) ^{abcd}	68.10(1,11) ^{bcd}	1.1x10 ⁶ (2,6x10 ⁵) ^{cde}	6.91(0,04) ^a	3.91(0,00) ^{de}
90	4°C	22.4(0,65) ^{abc}	0.77(0,02) ^{abcde}	40.33(0,40) ^{efg}	6.0(0,06) ^{abc}	67.96(0,44) ^{bcd}	3.6x10 ⁵ (2,4x10 ⁵) ^e	2.88(0,13) ^k	2.00(0,24) ^{jl}
90	20°C	22.0(1,15) ^{abcd}	0.70(0,01) ^{cde}	41.22(0,61) ^{cdefg}	5.8(0,03) ^{abcdef}	69.42(0,48) ^{abcd}	6.9x10 ⁵ (7,8x10 ⁴) ^{de}	5.82(0,27) ^{fgh}	5.08(0,01) ^{bc}
90	400MPa/2' 30"	18.1(1,02) ^{cdef}	0.70(0,01) ^{cde}	40.87(0,41) ^{defg}	5.7(0,02) ^{abcdefg}	67.03(1,13) ^{bcdef}	1.2x10 ⁶ (2,4x10 ⁵) ^{bcde}	6.58(0,06) ^{abcd}	3.88(0,01) ^{de}
90	500MPa/1'	18.5(0,84) ^{cdef}	0.71(0,00) ^{cde}	40.93(0,24) ^{cdefg}	5.8(0,04) ^{abcdef}	68.01(0,79) ^{bcd}	1.2x10 ⁶ (1,1x10 ⁵) ^{bcde}	6.85(0,04) ^{ab}	3.85(0,06) ^{def}
120	4°C	21.8(0,58) ^{abcd}	0.75(0,03) ^{abcde}	43.76(0,18) ^{abcde}	5.9(0,03) ^{abcde}	67.80(2,13) ^{bcd}	6.4x10 ⁵ (4,8x10 ⁵) ^e	2.71(0,02) ^k	2.28(0,090) ^{hij}
120	20°C	21.9(0,93) ^{abcd}	0.71(0,01) ^{cde}	44.35(0,85) ^{abcd}	5.8(0,07) ^{abcdef}	68.25(0,78) ^{bcd}	9.5x10 ⁵ (2,0x10 ⁵) ^{cde}	5.22(0,30) ^{hi}	5.26(0,02) ^b
120	400MPa/2' 30"	17.6(0,84) ^{def}	0.71(0,00) ^{cde}	44.69(0,60) ^{abc}	5.5(0,09) ^{cdefg}	69.11(0,29) ^{abcd}	2.2x10 ⁶ (8,7x10 ⁵) ^{abcde}	6.24(0,04) ^{def}	4.46(0,02) ^{cd}
120	500MPa/1'	17.6(1,05) ^{def}	0.70(0,00) ^{cde}	44.68(0,53) ^{abc}	5.7(0,02) ^{abcdefg}	67.90(0,21) ^{bcd}	3.9x10 ⁶ (3,9x10 ⁶) ^{abcde}	6.63(0,09) ^{abcd}	4.44(0,00) ^{cd}
150	4°C	20.8(0,90) ^{abcdef}	0.71(0,01) ^{cde}	42.85(0,38) ^{abcdef}	5.6(0,06) ^{bcdefg}	65.62(0,22) ^{def}	7.4x10 ⁵ (1,2x10 ⁵) ^{de}	2.84(0,01) ^k	2.69(0,00) ^{gh}
150	20°C	21.4(0,86) ^{abcde}	0.69(0,02) ^{de}	44.02(0,99) ^{abcde}	5.4(0,03) ^{efg}	65.55(0,90) ^{def}	1.6x10 ⁶ (2,0x10 ⁴) ^{abcde}	5.07(0,05) ^j	6.11(0,02) ^a
150	400MPa/2' 30"	18.3(1,00) ^f	0.69(0,01) ^{de}	43.20(0,44) ^{abcdef}	5.4(0,05) ^{defg}	67.37(1,92) ^{bcde}	6.5x10 ⁶ (1,6x10 ⁶) ^{abc}	5.87(0,17) ^{kj}	3.85(0,06) ^{def}
150	500MPa/1'	16.2(0,96) ^{cdef}	0.68(0,01) ^e	44.65(0,57) ^{abc}	5.3(0,10) ^{fg}	65.99(0,47) ^{cdef}	6.6x10 ⁶ (2,1x10 ⁶) ^{abcd}	6.00(0,12) ^{kj}	3.95(0,02) ^{de}
180	4°C	20.0(0,57) ^{bcdef}	0.71(0,02) ^{cde}	45.67(0,56) ^a	5.6(0,02) ^{bcdefg}	67.38(1,44) ^{bcde}	8.1x10 ⁵ (4,3x10 ⁵) ^{cde}	2.71(0,18) ^k	2.54(0,06) ^{ghi}
180	20°C	18.3(1,65) ^{cdef}	0.70(0,04) ^{cde}	45.89(3,28) ^a	5.4(0,09) ^{defg}	63.11(0,70) ^{ef}	5.4x10 ⁶ (1,4x10 ⁶) ^{abcde}	5.70(0,07) ^{gh}	6.38(0,00) ^a
180	400MPa/2' 30"	16.6(2,36) ^{ef}	0.70(0,01) ^{cde}	45.27(2,14) ^{ab}	5.4(0,11) ^{defg}	66.18(3,10) ^{cdef}	7.2x10 ⁶ (1,6x10 ⁶) ^{ab}	5.31(0,09) ^{hi}	5.38(0,02) ^b
180	500MPa/1'	17.9(0,20) ^{cdef}	0.68(0,05) ^e	45.50(0,30) ^a	5.2(0,44) ^g	65.60(1,04) ^f	7.0x10 ⁶ (1,3x10 ⁶) ^a	5.00(0,00) ^j	4.26(0,02) ^d

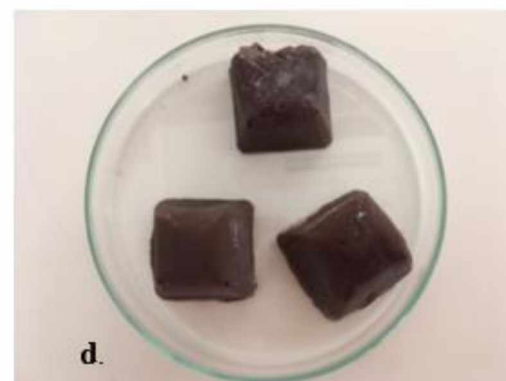
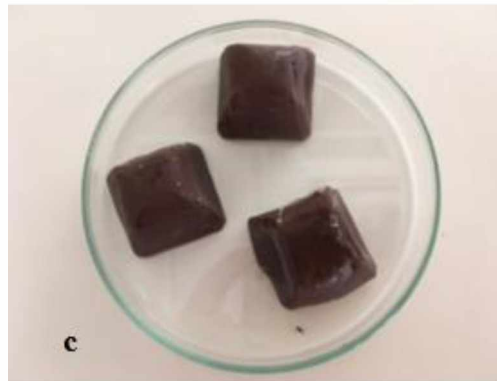
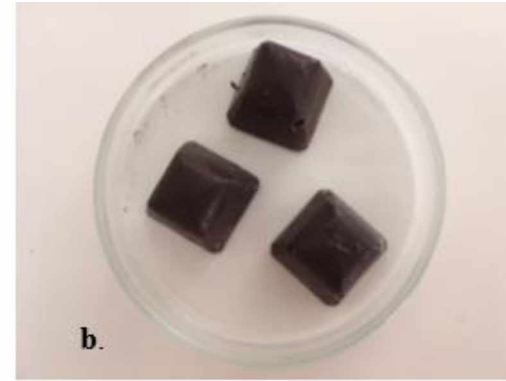
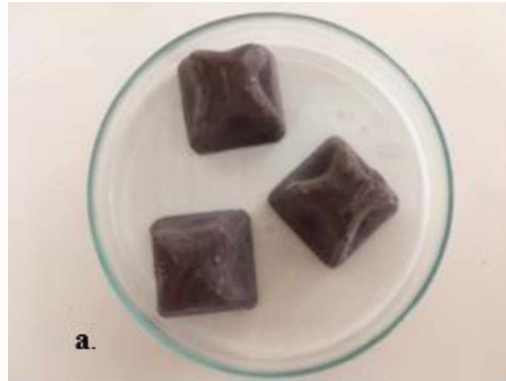


Figura A.1: Aspecto das amostras, ao fim dos 180dias. (a. 0,1MPa/20°C); b. 0,1MPa/ 4°C; c. 400MPa/20°C; d. 500MPa/20°C).