



CATOLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

PROCESSO DE DESCONGELAÇÃO DE ALIMENTOS EM
RESTAURAÇÃO COLETIVA

Por

Maria Gabriela Ferreira da Silva

Fevereiro, 2023



CATOLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

PROCESSO DE DESCONGELAÇÃO DE ALIMENTOS EM RESTAURAÇÃO COLETIVA

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Inovação

Por

Maria Gabriela Ferreira da Silva

Orientadora (Empresa): Dra. Ana Roseira

Coorientadora (Empresa): Dra. Beatriz Oliveira

Coorientadora (Universidade): Doutora Paula Teixeira

Fevereiro, 2023

Dedicatória

À minha família

Resumo

A temperatura é um dos fatores com maior impacto na cadeia de produção e confecção de alimentos, devido à sua contribuição para a atividade e crescimento de microrganismos. A descongelação de alimentos torna-se, desta forma, um dos grandes problemas na restauração coletiva, devido aos riscos que lhe estão inerentes.

De acordo com a bibliografia pesquisada, o processo de descongelação de alimentos deve ser realizado em ambiente refrigerado, ou seja, entre os 2°C e os 5°C, e durante o mínimo período de tempo possível, de forma a controlar processos indesejados, tais como o crescimento de microrganismos e a degradação alimentar.

Este trabalho surgiu com o objetivo de perceber o impacto da descongelação à temperatura ambiente no crescimento e desenvolvimento de microrganismos e respetiva influência na degradação dos alimentos.

Desta forma, avaliou-se a carga microbiana total e estudaram-se alguns microrganismos causadores de degradação: *Enterobacteriaceae*; *Pseudomonas* spp.; Bactérias do ácido láctico (BAL). Utilizaram-se amostras de carne e peixe, e avaliou-se o crescimento destes microrganismos nos produtos sujeitos a descongelação à temperatura ambiente (22°C) em cinco tempos de amostragem: tempo zero, quatro horas, oito horas, doze horas e 24 horas.

De acordo com os resultados obtidos, pode concluir-se que tanto as amostras de peixe, como as amostras de carne, 24 horas após descongelação à temperatura ambiente, apresentaram valores de microrganismos causadores de degradação acima dos valores recomendáveis. Nas amostras de carne, 24 horas sob as condições em estudo, os valores ultrapassaram os limites aceitáveis para *Pseudomonas* e Microrganismos totais, apresentando valores de 10^8 UFC/g. Já nas amostras de peixe, os valores recomendados foram ultrapassados para *Enterobacteriaceae* e BAL.

Tal como sugerido pela bibliografia, a descongelação deve ser realizada a temperaturas de refrigeração, no entanto, de acordo com os resultados obtidos no estudo, até 12 horas a descongelar à temperatura ambiente, os produtos analisados encontram-se aceitáveis para o parâmetro da qualidade.

Palavras-chave: descongelação, temperatura, tempo, microrganismos causadores de degradação

Abstract

Temperature is one of the factors with highest impact in the food production and confection, due to its contribution to the activity and growth of microorganisms. Defrosting of edibles becomes one of the greatest problems of contract catering due to its inherent risks.

According to the researched bibliography, food defrosting process should take place on a refrigerated environment, between 2°C and 5°C, and during the minimum possible time so undesirable processes can be controlled, as microorganism growth and food deterioration.

This work emerged with the objective of understanding the impact of defrosting at environmental temperature in development and growth of microorganisms and its influence in food deterioration.

To do this, the total microbial load was evaluated and some specific spoilage organisms: *Enterobacteriaceae*; *Pseudomonas* spp.; lactic acid bacteria (LAB) were studied. Samples of fish and meat were used, and the growth of this organisms on products submitted to defrosting was evaluated at environmental temperature (22°C) in five different sample times: time zero, four hours, eight hours, twelve hours and twenty-four hours after defrosting.

According to the obtained results, we can conclude that in both fish and meat samples, 24h after defrosting at environmental temperature, values of specific spoilage organisms above recommended were found. On the meat samples, there were levels above recommended of *Pseudomonas* spp and total microorganisms, with values of 10^8 UFC/g. For fish samples, the recommended values were exceeded for *Enterobacteriaceae* and LAB with values above acceptable.

As suggested by bibliography, defrosting should be performed at refrigeration temperatures. Although accordingly to this study results until 12 hours of defrosting at environment temperature the analysed products were in between range of acceptable parameters of quality.

Key-Words: defrosting, temperature, time, temperature, Specific spoilage organisms

Agradecimentos

Agradeço à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, por me ter acolhido desde a licenciatura.

À professora Paula Teixeira, reconheço o apoio prestado durante a realização deste trabalho de mestrado.

Deixo também o meu agradecimento aos alunos e investigadores do laboratório de Segurança Alimentar que me apoiaram e ajudaram em todo o processo laboratorial.

Um especial agradecimento à Dr.^a Ana Roseira, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e amizade.

À Eurest Portugal, na pessoa Dr.^a Beatriz Oliveira, agradeço a oportunidade de desenvolver o presente trabalho e por todo o apoio dado ao longo do meu percurso. A Eurest será sempre uma casa especial para mim.

E por fim, sou muito grata pelos meus amigos, que nunca me deixaram desistir, e pela minha família, por todo o apoio e amor incondicional.

Índice

Resumo	4
Abstract	5
Agradecimentos	6
I. Considerações introdutórias	9
II. Breve enquadramento	11
1. Importância da conservação de alimentos na restauração	11
2. Influência da temperatura na atividade microbiana	11
3. Processo de congelação e descongelação de alimentos	12
3.1. Efeito da congelação sobre os microrganismos	14
3.2. Efeito do processo de descongelação nos alimentos.....	14
4. Boas práticas de descongelação	17
4.1. Requisitos para uma descongelação segura	18
4.2 Métodos de descongelação de alimentos	19
4.3 Deterioração de alimentos.....	19
5. Parâmetros que influenciam a qualidade do produto congelado	21
5.1 Características do pescado e carne fresca	22
III. Objetivos	24
IV. Materiais e Métodos	24
1. Condições do estudo	24
2. Microrganismos em estudo	25
V. Resultados	28
VI. Discussão	35
VII. Conclusões	37
VIII. Trabalhos Futuros	38
IX. Bibliografia	39

I. Considerações introdutórias

Na restauração, os processos de conservação de alimentos são os pilares para que todo o processo de produção de refeições aconteça. A cadeia de frio e a confeção de alimentos utilizando o calor como fonte de energia são os processos mais antigos que o mundo da restauração utiliza para a conservação dos alimentos (Rainho de Almeida, 2013)

Os estudos demonstram (Associação Portuguesa de Nutrição, 2018; Loureiro, 2009; Rainho de Almeida, 2013) que a confeção de alimentos desempenha um papel fundamental para o controlo e eliminação de perigos microbiológicos e que processos como a refrigeração e congelação inibem o crescimento de microrganismos e abrandam a atividade enzimática, responsável pela degradação dos alimentos (Costa, 2010; Parlamento e Conselho Europeu, 2004).

Sendo a descongelação de alimentos uma das maiores problemáticas na restauração coletiva, devido aos riscos que lhe estão associados e à grande dificuldade de atingir os parâmetros recomendados, ainda são pouco os estudos que aprofundam este tema. Mais especificamente, no âmbito do comportamento do produto mediante alterações de algumas variáveis, como por exemplo:

- Que implicações (microbiológicas e organoléticas) têm nos alimentos as flutuações de temperatura durante o processo de descongelação?
- Quais os limites máximos de tempo e temperatura que o alimento pode sofrer durante o processo de descongelação de forma a garantir simultaneamente a segurança alimentar e preservar ao máximo as qualidades organoléticas?

Estes são apenas exemplos de questões que ainda estão por responder e a que o presente trabalho pretende dar resposta, contribuindo desta forma para o crescimento bibliográfico e científico da temática

Este relatório pretende apresentar respostas a estas questões e estruturar-se-á a partir do trabalho desenvolvido em parceria entre a empresa de restauração Eurest e a Universidade Católica Portuguesa.

A Eurest Portugal, foi fundada em Portugal pela Nestlé e pela Compagnie Internationales des wagons-Lits et du Tourisme, em 1974, conta com mais de 45 anos de experiência e é líder de mercado em diversos segmentos. Atualmente está presente na área da restauração coletiva (área

da saúde, ensino e empresarial), restauração pública (áreas de serviço e cafeterias), *catering e Vending* (Eurest, n.d.). Atualmente serve mais de 27 milhões de refeições por ano e conta com mais de 3000 funcionários (Eurest, n.d.).

Este trabalho irá centrar-se numa revisão bibliográfica acerca das recomendações emitidas a nível global sobre o processo da descongelação, bem como numa reflexão acerca do procedimento interno estabelecido para a descongelação de alimentos de origem animal. Baseando-se na análise microbiológica de amostras de produtos de origem animal expostos à temperatura ambiente por diferentes períodos. Espera-se que no final seja possível validar novos limites do tempo máximo de exposição destes produtos a temperatura não controlada e, eventualmente, rever ou reajustar os procedimentos internos da empresa.

II. Breve enquadramento

1. Importância da conservação de alimentos na restauração

A conservação de alimentos por longos períodos, é algo que acontece desde os primórdios, o que aguçou no Homem curiosidade e a procura de formas eficazes para a sua concretização (Pereira & Ávila, 2015).

A necessidade de conservar alimentos, já é algo que vem de há muito tempo, o que proporcionou avanços na área da tecnologia alimentar (Fellows, 2000). Atualmente, na restauração, a conservação de alimentos é feita, utilizando maioritariamente a cadeia de frio, ou seja, o processo de refrigeração de alimentos e a congelação (AHRESP - Associação da Hotelaria, 2015). O aquecimento é um método clássico de conservação de alimentos, e são vários os estudos que demonstram o seu papel fundamental no controlo dos perigos microbiológicos, desde que aplicado corretamente o binómio tempo/temperatura associado a este processo (Costa, 2010; World Health Organization, 2009).

De seguida farei uma breve contextualização acerca dos microrganismos naturalmente presentes nos alimentos e aprofundarei o processo de congelação e descongelação de alimentos que surgiram para dar resposta a esta necessidade de evolução na restauração.

2. Influência da temperatura na atividade microbiana

A temperatura é um dos fatores mais importantes na cadeia de produção de alimentos. Os aspetos mais relevantes relacionados com os géneros alimentícios e controlo das temperaturas encontram-se descritos no Regulamento da Higiene dos Géneros Alimentícios (Parlamento e Conselho Europeu, 2004). Atualmente, sabe-se que a temperatura é o fator com maior relevância no que toca à atividade e crescimento microbiano.

Assim, quanto mais baixa for a temperatura, mais lentas serão as reações bioquímicas, enzimáticas e o crescimento microbiano (Nicolau, 2014). Os estudos demonstram que a temperatura ideal para o crescimento microbiano se situa no intervalo de 5°C e 65°C, intervalo esse denominado por “Zona de perigo” (Abgrall & Misner, 1998; Costa, 2010). Desta forma,

segundo Esteves et al, para evitar o crescimento e desenvolvimento microbiano, é necessário manter as temperaturas em valores inferiores a 5°C ou superiores a 65°C (Esteves et al., 2002).

A figura 1 ilustra a relação entre a taxa de crescimento dos microrganismos e a temperatura.

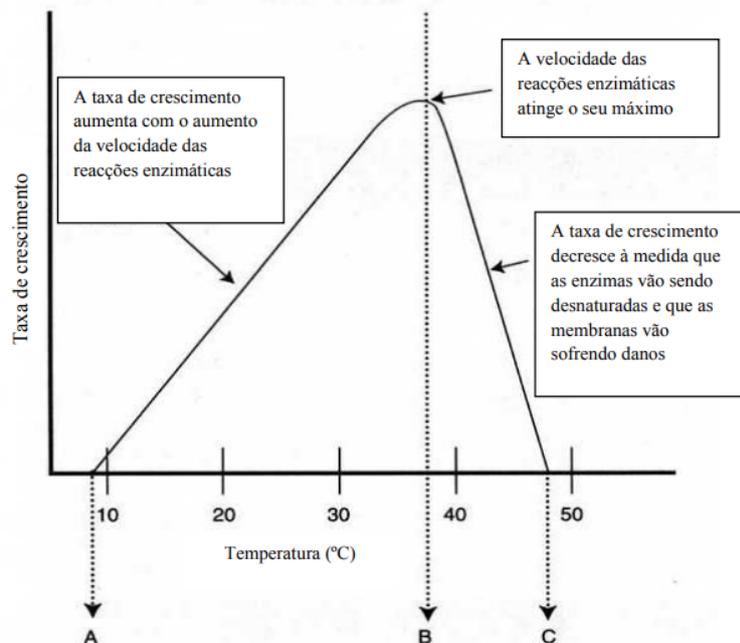


Figura 1: Taxa de crescimento microbiano e a influencia da temperatura. Fonte: (Garbutt,1997)

3. Processo de congelação e descongelação de alimentos

A congelação é uma técnica ancestral para a conservação dos alimentos, que teve a sua origem na China (Archer, 2004). Esta técnica é considerada a mais bem-sucedida para a conservação dos alimentos a longo prazo (Archer, 2004) visto que, o conteúdo de nutrientes é preservado, e o produto congelado assemelha-se ao produto fresco (Adams & Moss, 2000).

Este processo, teoricamente é dividido em três fases: diminuição da temperatura no centro térmico do produto, seguido da formação de cristais de gelo e por último, redução da temperatura do alimento até à temperatura de congelação (-18°C) (Alizadeh, E., Chapleau, N., de Lamballerie, M., & LeBail, 2007).

No processo de congelação de alimentos, a conversão de água em gelo aumenta a concentração de solutos dissolvidos em água não congelada e, assim, a atividade da água do alimento diminui (Costa, 2010). Desta forma, este método de conservação de alimentos tem um duplo efeito inibidor sobre os microrganismos, afetando o crescimento devido à aplicação de temperaturas inferiores ao seu mínimo e à obtenção de baixas concentrações de água disponível (Costa, 2010). Dependendo do tipo de alimento considerado, este método, permite que o alimento seja armazenado durante um maior período (Archer, 2004).

A congelação pode ser um processo rápido ou lento. A congelação rápida, é feita a -20°C e em 30 min, a congelação lenta refere-se ao processo pelo qual a temperatura desejada é obtida em 3-72 horas (Costa, 2010).

O quadro 1 ilustra as maiores diferenças entre os dois métodos de congelação

Quadro 1: Comparação dos métodos de congelação.

Congelação rápida	Congelação lenta
Formação de pequenos cristais de gelo	Formação de grandes cristais de gelo
Bloqueio ou supressão do metabolismo	Colapso da comunicação do metabolismo
Exposição rápida à concentração de constituintes adversos	Exposição prolongada a condições adversas ou fatores prejudiciais
Não há adaptação a temperaturas baixas Choque térmico	Adaptação gradual
Não existem efeitos protetores	Não existem efeitos protetores
Evita o desequilíbrio metabólico interno	Acumulação de solutos concentrados com efeitos benéficos

Fonte: (Jay, J. M., Loessner, M. J. e Golden, 2005)

Entre estes dois processos, existem vantagens e desvantagens, sendo que as vantagens da congelação rápida superam a congelação lenta. A congelação quando é feita de forma rápida resulta em cristais de menores dimensões, em comparação com a dimensão dos cristais formados pela congelação lenta (Costa, 2010). De notar que, quanto menor a dimensão dos cristais de gelo, menor o dano sobre as células e tecidos que constituem o alimento, o que permite uma melhor conservação das características sensoriais e organoléticas do mesmo. Assim, a congelação retarda a deterioração dos alimentos e aumenta a sua segurança, não só por impedir o desenvolvimento de microrganismos mas, também, pelo abrandamento da

atividade enzimática que pode causar deterioração. Apesar de alguns microrganismos serem destruídos durante o processo de congelação, esta não pode ser encarada como tendo ação microbicida, porque a maioria dos microrganismos, com exceção dos parasitas, sobrevivem, motivo pelo qual os alimentos devem ser manipulados cuidadosamente tanto antes como depois da descongelação (Fellows, 2000).

3.1.Efeito da congelação sobre os microrganismos

Quando os microrganismos são submetidos a congelação, uma parte da população microbiana, 40 a 90%, poderá sobreviver. Esta percentagem de sobrevivência é difícil de prever, uma vez que depende de vários fatores (Costa, 2010; Garbutt, 1997):

- Tipo de microrganismos: Gram-negativos são mais suscetíveis à congelação, quando comparados com os Gram-positivos;
- A variação do arrefecimento até à temperatura final de armazenamento;
- A temperatura final à qual o alimento é congelado;
- A composição do alimento;
- O tempo de armazenamento, quando congelado;
- O tratamento antes da congelação;
- A taxa de descongelação;

3.2.Efeito do processo de descongelação nos alimentos

Depois de perceber o processo de congelação, e a sua importância na conservação dos alimentos, é importante perceber o processo inverso, a descongelação dos alimentos. Este processo é um dos pontos de maior preocupação nos estabelecimentos de restauração, devido aos riscos inerentes e à dificuldade de atingir os parâmetros recomendados (Allen et al., 1997; Cox, 2001; GSO 1016/2015 (E), 2015; ICMSF, n.d.; INSA, 2019; Mehyar, 2005; Ministry of Health, 1995; Popovic et al., 2010; Thornley et al., 1960).

Durante o processo de descongelação, são várias as modificações indesejáveis que podem ocorrer, desde modificações químicas (como a insolubilização da proteína e oxidação dos

lípidos), a mudanças físicas (como a recristalização e mudanças no volume das células). Além destas alterações, pode ocorrer o crescimento de microrganismos, principalmente quando o processo de descongelação não é feito de forma adequada (Colla & Prentice-Hernández, 2003), ou seja, as temperaturas não são baixas o suficiente (ex.: acima dos 5°C).

O tempo de descongelação é definido pelo tempo necessário para que a temperatura passe do ponto de congelação até à temperatura a que deixe de haver vestígios de gelo (Manso Rodrigues, 2013). Deve ter-se em conta que os alimentos após sofrerem descongelação, aumentam a sua sensibilidade a alterações microbiológicas, bioquímicas e químicas (Manso Rodrigues, 2013). Tal como o apresentado na figura 1, é importante ter em conta que o binómio tempo-temperatura, difere da congelação para a descongelação, sendo a primeira um processo mais rápido relativamente à segunda. (Manso Rodrigues, 2013).

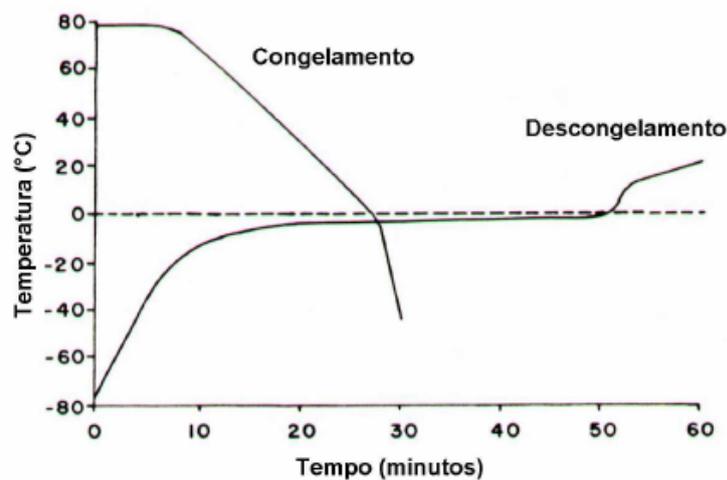


Figura 2- Curva de congelação e descongelação para o centro geométrico de um cilindro com gel de amido. (Rocha, 2008)

A figura 3, ilustra a curva de descongelação e as suas diferentes fases:

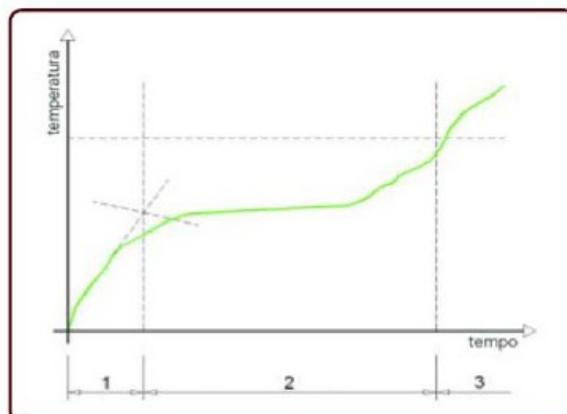


Figura 3. Curva de temperatura na fase de descongelação (Rocha, 2008)

Segundo a curva representada na figura 3, o processo de descongelação passa por três fases (Rocha, 2008):

- 1ª Subida da temperatura até ao ponto de descongelação;
- 2ª Descongelação;
- 3ª Aquecimento acima do ponto de fusão final;

O processo de descongelação dos produtos alimentares é fundamental para controlar/evitar o crescimento de microrganismos. A descongelação dos alimentos deve decorrer no mínimo tempo possível e a temperatura de refrigeração, quer por razões de ordem higio-sanitária, quer por razões nutritivas (AHRESP-Associação da Hotelaria, 2015). A descongelação feita de forma “não controlada” provoca condensação e crescimento de microrganismos, resultando assim em processos de decomposição (Contreras-Guzmán, 1994).

3.2.1. Crescimento de microrganismos durante o processo de descongelação

A temperatura limite para o crescimento de microrganismos em alimentos é de -5°C a -8°C, e abaixo dos 3°C para o crescimento de leveduras. A temperaturas de -18°C, ou seja, temperaturas de congelação, não existe crescimento de nenhum microrganismo. No entanto, *Pseudomonas* spp. e leveduras podem estar presentes, não apresentando, no entanto, taxas de crescimento/desenvolvimento (Colla & Prentice-Hernández, 2003). Segundo Mossel et al. (1995) bactérias psicrófilas, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* e *Proteus*, que crescem a temperaturas de refrigeração, continuam o seu crescimento durante a descongelação, se este for realizado de forma lenta (Mossel & Moreno Garcia, 1995). No entanto, se a descongelação for tão rápida como a congelação, não ocorre o crescimento bacteriano de forma apreciável (Feitosa, 1999).

4. Boas práticas de descongelação

A descongelação dos alimentos deve ser feita em equipamentos de frio ou, se necessário, utilizando as técnicas de descongelação de emergência (descongelação em água fria corrente ou micro-ondas). Alguns estudos, como o de Fonseca Loureiro (2009) referem que a descongelação nunca deve ser feita à temperatura ambiente, uma vez que esta promove o desenvolvimento de bactérias patogénicas (Loureiro, 2009). Estes autores referem ainda que este processo deve ser feito a uma temperatura entre os 2°C e os 5°C, e não deve ultrapassar o período máximo de 24 horas entre a descongelação e a confeção (Loureiro, 2009). Os produtos em descongelação devem estar tapados e em bacias com fundo perfurado, para que o líquido de exsudação não fique em contacto direto com o alimento (Loureiro, 2009; Parlamento e Conselho Europeu, 2004). Uma forma de controlar a quantidade de exsudado é realizar o processo a temperaturas de refrigeração (Colla & Prentice-Hernández, 2003).

Depois da descongelação, os alimentos devem ser manuseados de forma a minimizar o risco de desenvolvimento de microrganismos patogénicos ou a formação de toxinas (Parlamento e Conselho Europeu, 2004).

Sintetizando, o Código de Boas Práticas de Higiene e Segurança Alimentar para a pequena restauração e bebidas da AHRESP (AHRESP - Associação da Hotelaria, 2015) elenca um

conjunto de boas práticas a ter em conta para realizar o processo de descongelação de maneira segura:

- 1) Planear com antecedência, de forma a permitir que os alimentos tenham tempo e espaço suficientes para descongelar no equipamento de frio;
- 2) A descongelação deve decorrer no mínimo tempo possível e a temperatura controlada, quer por razões de ordem higio-sanitária, quer por razões nutritivas;
- 3) A descongelação dos produtos deve ser feita em frio positivo, a uma temperatura máxima de 4°C;
- 4) Descongelar alimentos no micro-ondas, usando a opção apropriada;
- 5) Quando se descongelam alimentos, deve ter-se o cuidado de evitar que a água de descongelação (exsudado) se vá acumulando junto deste, ou de outros alimentos, visto constituir um bom meio para a proliferação microbiana;
- 6) Os produtos descongelados devem ser mantidos no frio e confeccionados num prazo máximo de 24 horas;

4.1. Requisitos para uma descongelação segura

Sendo a descongelação de alimentos uma das etapas de maior importância nos estabelecimentos que preparam alimentos, devido a todos os riscos inerentes a este processo, torna-se essencial definir os requisitos para uma descongelação segura dos alimentos. Assim destacam-se as seguintes boas práticas (Loureiro, 2009) :

- Utilizar um equipamento de refrigeração a 4°C;
- Descongelação de emergência utilizando o micro-ondas;
- Em água com temperatura inferior a 21°C por 4 horas;
- A temperatura ambiente, em local sem contaminação ambiental, monitorizando sempre a temperatura superficial do produto, sendo que se atingir temperaturas de 3°C /4°C deve-se continuar com a descongelação temperaturas de refrigeração;
- Utilizar peças de carne ou de pescado até 2 Kg;

- Após a descongelação, o produto deve aguardar até à sua preparação/confeção em temperaturas de refrigeração;

4.2 Métodos de descongelação de alimentos

Nem sempre é possível realizar a descongelação de forma adequada, ou seja, a temperaturas de refrigeração. Existem dois processos validados e considerados seguros, a descongelação rápida de emergência, feita com água fria corrente e a descongelação utilizando o micro-ondas (Rainho de Almeida, 2013). Importa salientar que, o recurso a estes mesmos métodos, só deve ser feito na impossibilidade de descongelar com o método tradicional.

4.3 Deterioração de alimentos

São vários os microrganismos que atuam na degradação dos alimentos, e estes foram o foco de análise no presente trabalho.

Em seguida, irei enumerar algumas características dos mesmos:

4.3.1. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae inclui microrganismos anaeróbios facultativos, e são geralmente utilizados para avaliar o estado geral de higiene de produtos alimentares. Todas as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são possíveis de destruir através do processamento térmico dos alimentos (Moura, 2016). Assim, *Enterobacteriaceae* são excelentes indicadores do cumprimento de BPH (Boas Práticas de Higiene) e de um tempo de utilização controlado, em alimentos crus prontos para consumo (INSA, 2019).

No que diz respeito à qualidade dos produtos cárneos, tendo como indicador a frescura, os estudos indicam que valores inferiores a 10^7 UFC/g (ICMSF, n.d.) são considerados aceitáveis. Estudos que avaliam a frescura do peixe indicam que valores até 10^2 UFC/g para *Enterobacteriaceae*, são considerados aceitáveis para o parâmetro da qualidade do produto (Popovic et al., 2010).

Para alimentos prontos a comer, um elevado número destes microrganismos, ou seja, valores superiores a 10^4 UFC/g, indica que ocorreu um nível inaceitável de contaminação (Environmental Health Australia, 2001). Assim, consideram-se níveis satisfatórios valores inferiores a 10^2 UFC/g, aceitável entre 10^2 e 10^4 UFC/g, e não satisfatórios se os valores forem superiores a 10^4 UFC/g (Environmental Health Australia, 2001).

4.3.2. *Bactérias do ácido láctico*

As bactérias do ácido láctico (BAL) morfologicamente, são bacilos ou cocos Gram positivo, não sendo formadoras de endósporos. Apesar de serem aerotolerantes, são bactérias características de ambientes anaeróbios, muito exigentes do ponto de vista nutricional e que suportam valores de pH muito baixos, sendo a tolerância à acidez uma característica variável entre estirpes (Gonçalves, 2009).

O crescimento das BAL pode ser responsável pela degradação dos alimentos. Segundo Hugas (1998), o crescimento destas bactérias pode levar à produção de odores desagradáveis nos alimentos e, à formação de cavidades no interior dos produtos, devido à produção de CO_2 (Gonçalves, 2009; Hugas, 1998).

As BAL não são patogénicas. No entanto, quando presentes, podem provocar alterações organolépticas nos produtos. Desta forma, são consideradas um indicador da frescura do produto e uma ferramenta de avaliação do prazo de vida útil. Sendo a razão entre a Contagem de Aeróbios Mesófilos (CAM) e BAL um indicador de qualidade do produto, se esta razão for inferior a 100 a qualidade do produto não é colocada em causa (INSA, 2019).

4.3.3. *Pseudomonas*

Pseudomonas são bastonetes Gram-negativos, aeróbios, produtores de pigmentos hidrossolúveis (Alcantara et al., 2012). Este tipo de bactérias são, tal como as que vimos anteriormente, indicadores de degradação dos alimentos, que provocam e levam a alterações em características físicas, químicas e organolépticas dos alimentos (Alcantara et al., 2012).

Segundo Thorneley et al., produtos cárneos com valores inferiores a 10^7 UFC/g, estão ainda com níveis de frescura aceitáveis (Allen et al., 1997; Cox, 2001; Mehyar, 2005; Thornley et al., 1960). Já para o peixe, estudos apontam para valores de 10^6 UFC/g (GSO 1016/2015 (E), 2015).

4.3.4. *Microorganismos totais*

A contagem de microrganismos a 30°C, também conhecida como “contagem de totais viáveis” ou “contagem de aeróbios mesófilos” (CAM), não se expressa diretamente na avaliação da segurança de alimentos. Estes são indicadores de qualidade e validade do produto, uma vez que são responsáveis pela sua deterioração (INSA, 2019; Moura, 2016; SCF, 2002). Um elevado número de colónias pode significar problemas de qualidade e pode ter como principal causa a exposição do produto a temperaturas inadequadas.

Quando as contagens totais são inferiores a 10^6 UFC/g, estão geralmente associadas a uma microbiota mista. Acima deste nível, há geralmente um organismo predominante e a aceitabilidade e qualidade organoléptica dos alimentos irá depender do tipo de microrganismo que predomina (INSA, 2019; Moura, 2016).

5. Parâmetros que influenciam a qualidade do produto congelado

A qualidade do produto alimentar depende de vários parâmetros, nomeadamente (Instituto nacional del frio, 1990; Manso Rodrigues, 2013):

- Origem do produto e a sua qualidade no momento da congelação;
- Operações de preparação e congelação;
- Tipo de embalagem do produto;
- Temperatura de armazenamento e flutuações de temperatura;
- Duração do armazenamento;

5.1 Caraterísticas do pescado e carne fresca

Tal como referido anteriormente, a qualidade do produto congelado vai depender da qualidade a que o produto está em fresco. Assim, depreende-se que, quanto maior a qualidade e frescura do produto previamente à congelação, maior será a sua qualidade quando congelado.

Relativamente ao pescado, a degradação do mesmo causa alterações organoléticas, químicas, físicas e microbiológicas. Desta forma, o pescado fresco deve apresentar as seguintes características sensoriais (Manso Rodrigues, 2013):

Pele: Brilhante, húmida, tonalidade viva, sem lacerações;

Muco: Ausente. Se característico da espécie, este deve ser aquoso;

Escamas: Unidas entre si, fortemente aderidas à pele, translúcidas e com brilho;

Carne: Firme, elástica e com boa aderência às suas espinhas;

Opérculo: Rígido;

Guelras: Vermelhas, húmidas e brilhantes;

Olhos: Salientes, transparentes e brilhantes;

Odor: Suave ou ausente;

Já no que diz respeito à carne, e segundo Smulders (F. J. M. Smulders, 1986) os consumidores quando pretendem comprar carne fresca devem ter em conta dois grupos de fatores. O primeiro diz respeito à textura e cor da carne, o segundo com a qualidade da carne, ou seja, suculência e sabor (F. J. M. Smulders, 1986).

Sabe-se que o pH e a temperatura têm um grande impacto nesses fatores (F. J. M. Smulders, 1986). No entanto, sabe-se, também, que estas caraterísticas organoléticas variam consoante o tipo de carne, ou seja, entre carnes brancas e carnes vermelhas, e de acordo com o tipo de alimentação que é dada aos animais antes do seu abate (Frescura et al., 2005). Assim, ao contrário do que acontece no peixe, não podemos tirar conclusões sobre as caraterísticas organoléticas da carne fresca. Os estudos consultados apenas revelam as mudanças físicas e

químicas que ocorrem na carne para que esta atinja um padrão de qualidade aceitável para os consumidores (Frescura et al., 2005).

III. Objetivos

Com este trabalho pretende-se:

- Identificar as diferentes recomendações a nível global acerca das boas práticas e limites de tempo/temperatura e microbiológico no âmbito do processo de descongelação;
- Definir e validar novos limites de tempo/temperatura durante o processo de descongelação em função da categoria do alimento e da dimensão da peça;
- Efetuar a análise microbiológica dos produtos em estudo de forma a traçar um perfil comportamental ao longo do processo, de acordo com os intervalos em estudo;
- Avaliar o impacto das flutuações de temperatura no processo de descongelação;

Espera-se que este trabalho permita à empresa:

- Redefinir ou ajustar procedimentos relacionados com o processo de descongelação;
- Aumentar o grau de confiança no processo;

IV. Materiais e Métodos

1. Condições do estudo

Foi realizado um estudo para avaliação da qualidade microbiológica de produtos de origem animal que sofreram descongelação à temperatura ambiente. Este estudo incidiu em amostras de dois tipos de produtos: frango em filete e pescada em filete, de marcas comerciais utilizadas na restauração coletiva. Selecionaram-se estes produtos uma vez que são os mais consumidos na restauração.

Analisou-se um total de 30 amostras, sujeitas às condições do estudo que abaixo se descrevem.

Para testar a influência da descongelação à temperatura ambiente na carga microbiológica dos produtos ao longo do processo consideraram-se cinco tempos de exposição diferentes: zero horas (t0), quatro horas (t4), oito horas (t8), doze horas (t12) e vinte e quatro horas (t24). As amostras foram sujeitas, à temperatura ambiente (21/22°C), durante o período em análise.

Utilizou-se como controlo a amostra em t0, ou seja, sem sofrer descongelação.

Foram recolhidos 2 kg de filetes de pescada e 2kg de filetes de frango, que foram transportadas das unidades de restauração até ao laboratório em malas térmicas e com acumulador de frio, para minimizar desvios de temperatura. No laboratório, foram conservados no congelador a uma temperatura entre -18°C e -21°C, até ao momento do ensaio.

Para cada ensaio, foram retiradas amostras de 25g de cada produto, em condições de assepsia, garantindo a correta esterilização de todos os instrumentos utilizados recorrendo à chama.

As amostras de carne foram codificadas com a letra A (A1, A2, A3) e as de peixe com B (B1, B2, B3). Cada amostra foi analisada em triplicado para cada tipo de produto (frango e pescada) e para cada tempo (t0 a t24), totalizando 30 amostras.

Cada amostra foi analisada para os 4 parâmetros microbiológicos que abaixo se descrevem em maior detalhe, perfazendo um total de 120 ensaios laboratoriais.

2. Microrganismos em estudo

Além da carga microbiana total (CAM) foram estudados alguns microrganismos causadores de degradação: *Enterobacteriaceae*; *Pseudomonas spp.*; Bactérias do ácido láctico (BAL).

Em sacos esterilizados, colocou-se a amostra previamente pesada (25g). No tempo em estudo, foram adicionados 225 mL de água peptonada tamponada (BPW) e as amostras foram homogeneizadas no *Stomacher* (suspensão mãe, 1:10). A partir dessa suspensão prepararam-se sete diluições decimais sucessivas em solução de Ringer esterilizada.

Foram utilizados como meios de cultura para enumeração: *Rapid Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas Agar Base* (PAB), *Plate Count Agar* (PCA) e de *Man-Rogosa Sharpe agar* (MRS).

Para a contagem de microrganismos em placas de meio de cultura sólido, utilizou-se a técnica de incorporação para os meios PCA, *RAPID'Enterobacteriaceae* e MRS. Nesta técnica, uma porção de amostra (1 mL) é diluída e posteriormente misturada com o meio de cultura em questão ainda no estado líquido, contando-se posteriormente as colónias desenvolvidas à superfície e no interior do ágar, após a sua solidificação e incubação (Cunha, 2017).

A técnica de espalhamento foi utilizada apenas para o meio PAB. Nesta técnica uma amostra de 0,1mL é espalhada sobre a superfície do meio de cultura em questão, já solidificada, e após incubação, as colónias desenvolvidas são contadas (Cunha, 2017).

Método da incorporação em placa:

Meio RAPID'Enterobacteriaceae: Suspenderam-se 38g de *Rapid Enterobacteriaceae Agar* num litro de água desionizada. Misturou-se até obter uma suspensão completamente homogênea. Em seguida, aqueceu-se lentamente, até atingir o ponto de fervura. Posteriormente, deixou-se o meio arrefecer até aos 44-47°C. Este meio não pode ir à autoclave.

Colocou-se o meio em placas de Petri e deixou-se solidificar. Após inoculação das várias diluições das amostras, as placas foram incubadas a 37°C durante vinte e quatro horas. Posteriormente, enumeram-se as colónias características de *Enterobacteriaceae* nas placas que apresentavam contagens entre 15 e 150 (Bio Rad, n.d.).

Os resultados serão posteriormente apresentados em forma de gráfico.

Meio PCA: Suspenderam-se 20,5g de meio desidratado num litro de água desionizada. Para obter a dissolução da preparação utilizou-se um agitador magnético. Após uma completa dissolução do meio, recorreu-se à autoclave a 121°C por quinze minutos. Em seguida, deixou-se arrefecer a 44-47°C. Por fim, colocou-se o meio nas placas de Petri para este solidificar (Biokar diagnostics, 2020).

Após a incubação a 30°C durante 72 horas (Biokar diagnostics, 2020), enumeraram-se todas as colónias características nas placas que apresentavam um número de colónias entre trinta a trezentas. Os resultados serão posteriormente apresentados em forma de gráfico.

Meio MRS: Suspenderam-se 70,3g de meio desidratado num litro de água desionizada. Agitou-se até dissolver e obter um meio homogêneo. Levou-se à autoclave a esterilizar a 121°C por

quinze minutos. Por fim, arrefeceu-se o meio a 44-47°C, e colocou-se nas placas de Petri (Biokar diagnostics, 2017).

Realizou-se a incubação por 72 ± 3 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ em condições aeróbias. Após incubação, contaram-se as placas com contagens entre quinze a cento e cinquenta. Os resultados serão posteriormente apresentados em forma de gráfico.

Método de Plaqueamento

Meio PAB: Suspenderam-se 40g de meio desidratado num litro de água desionizada. Agitou-se utilizando o agitador magnético até dissolução completa. Esterilizou-se o meio na autoclave a 121°C por 15 minutos. Em seguida, deixou-se arrefecer até $45-47^\circ\text{C}$ e colocou-se o meio nas placas (Biokar diagnostics, 2020)

Para este meio, utilizou-se o método de *Plaquament*. Desta forma, recorreu-se ao *Spiralplate* para realizar o espalhamento em placa. Após a incubação a 30°C por 72 horas, enumeram-se as colónias características, neste caso *Pseudomonas*. A leitura para a enumeração das colónias foi efetuada através do SCAN 500® interscience, versão 8.3.1.0.

Os resultados serão posteriormente apresentados em forma de gráfico.

V. Resultados

Utilizou-se a fórmula $N = \frac{\sum C}{V \times 1.1 \times d}$ para calcular o número de unidades formadoras de colónias por grama de produto (UFC/g) para cada tempo em estudo. Em seguida, para facilitar os cálculos e a sua apresentação, calculou-se o seu logaritmo (ISO//TC 34, 2013).

$\sum C$ – somatório das colónias contáveis nas duas placas de duas diluições sucessivas, em que pelo menos uma delas contém um mínimo de 10 colónias;

V- Volume de inóculo transferido para cada placa

d- Diluição correspondente à primeira contagem

Os resultados obtidos são apresentados nos gráficos abaixo.

Gráficos obtidos de acordo com os resultados laboratoriais

○ *Enterobacteriaceae*

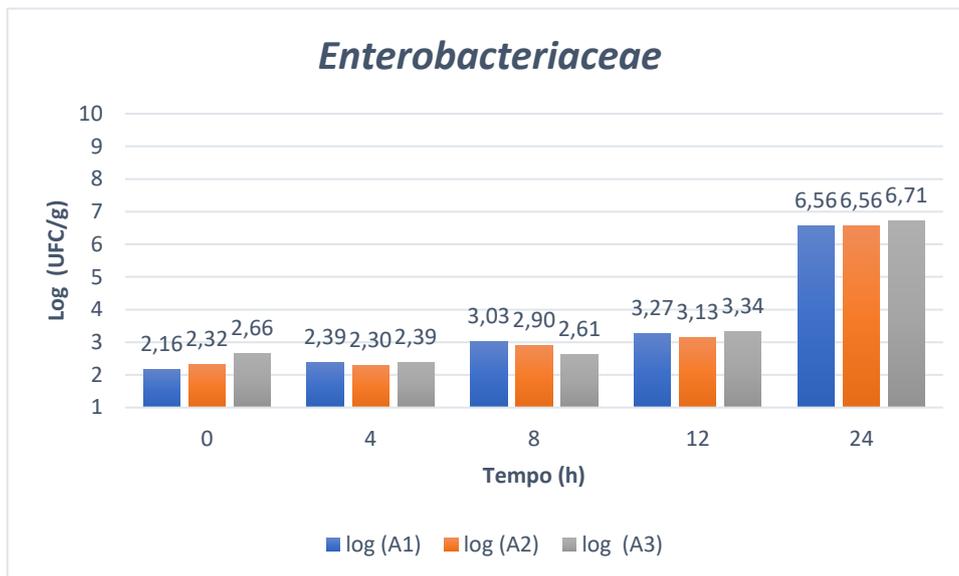


Gráfico 1: Crescimento de *Enterobacteriaceae* em filetes de frango (log UFC/g), quando descongelados à temperatura ambiente, ao longo do tempo (h). Limite de detecção: 100 UFC/g

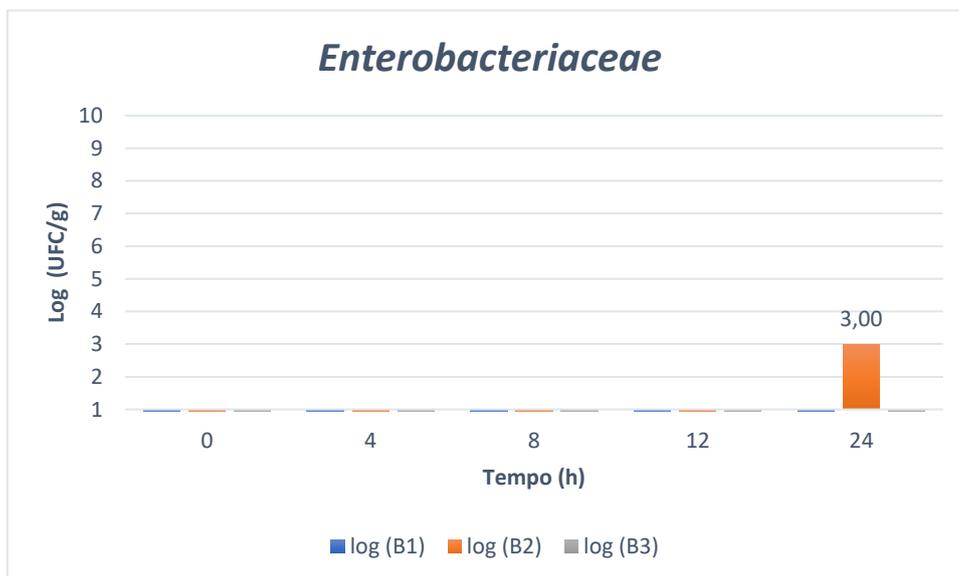


Gráfico 2: Crescimento de *Enterobacteriaceae* em filetes de pescada (log UFC/g), quando descongelados à temperatura ambiente, ao longo do tempo (h). Limite de detecção: 100 UFC/g.

○ **Bactérias do ácido lático (BAL)**

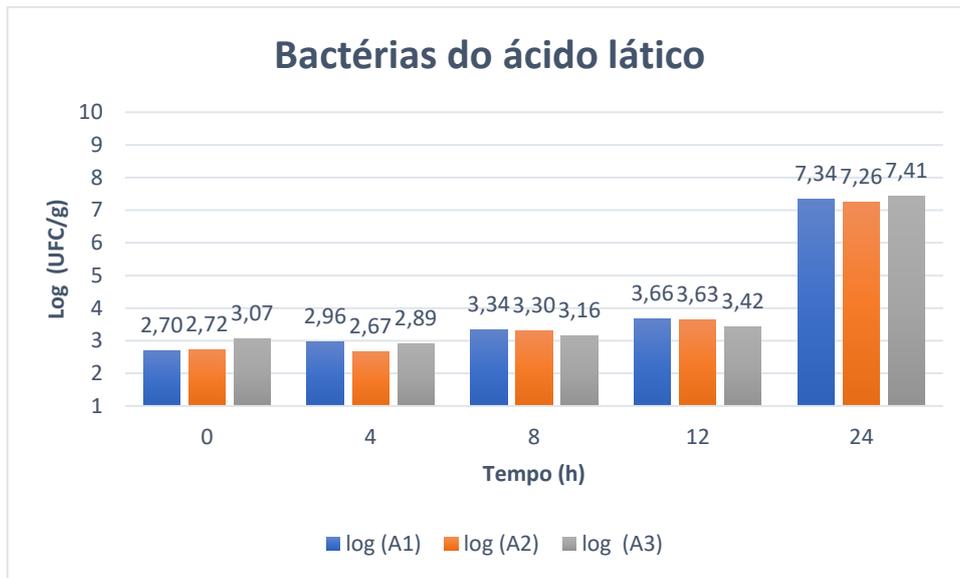


Gráfico 3: Crescimento BAL em filetes de frango (log UFC/g), quando descongelados à temperatura ambiente, ao longo do tempo (h). Limite de detecção: 100 UFC/g

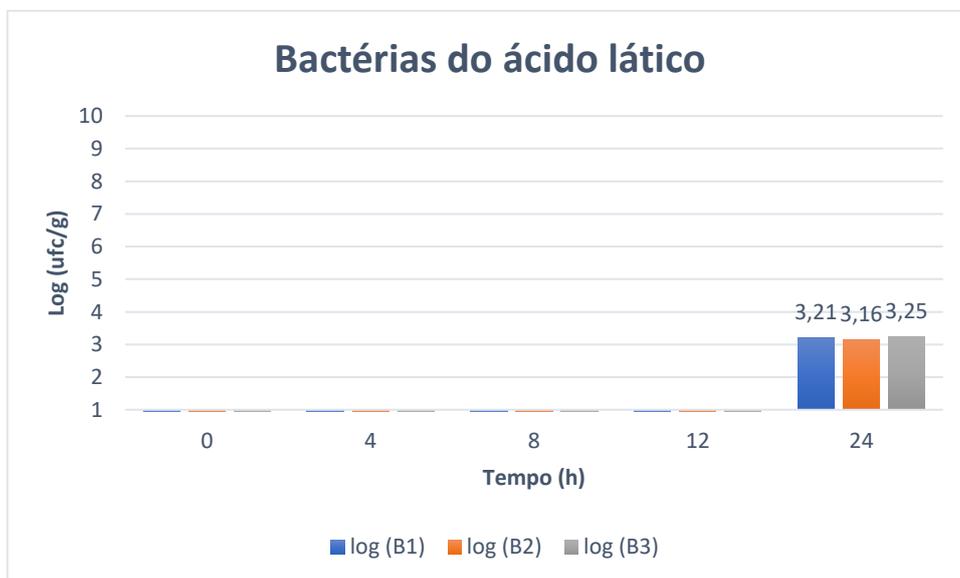


Gráfico 4: Crescimento das BAL em filetes de pescada (log UFC/g), quando descongelados à temperatura ambiente, ao longo do tempo (h). Limite de detecção: 100 UFC/g.

○ *Pseudomonas*

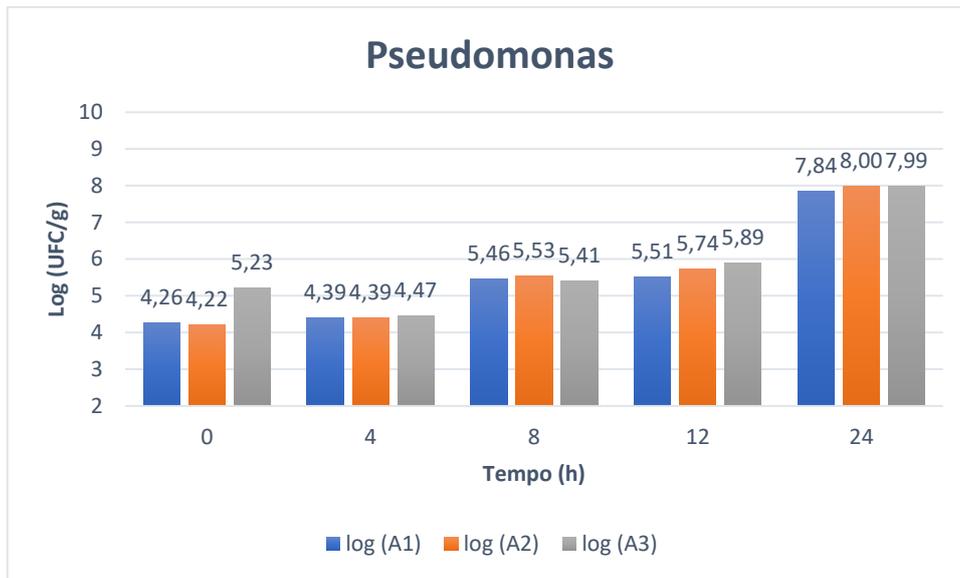


Gráfico 5: Crescimento de *Pseudomonas* em filetes de frango (log UFC/g), quando descongelados à temperatura ambiente, ao longo do tempo (h). Limite de detecção: 10 UFC/g

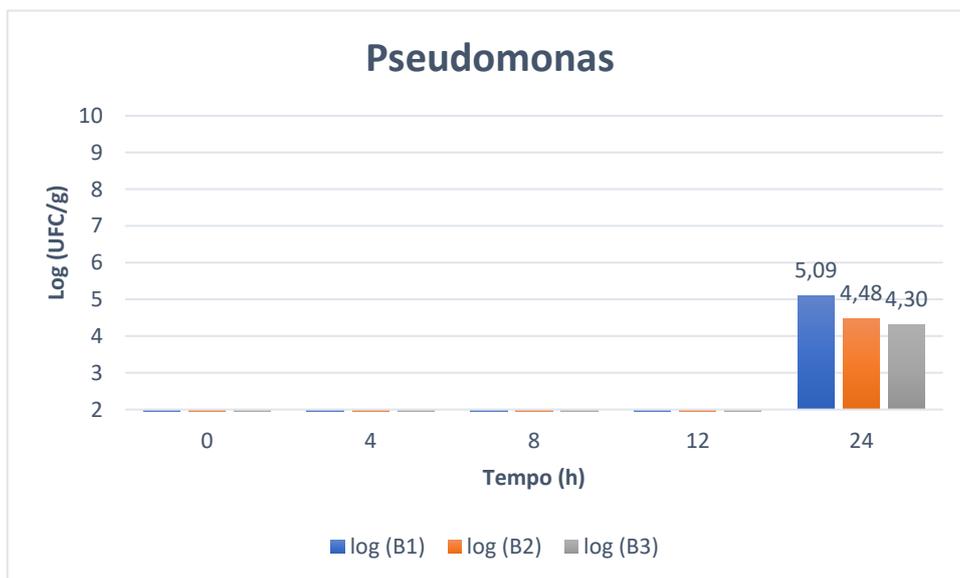


Gráfico 6: Crescimento de *Pseudomonas* em filetes de pescada (log UFC/g), descongelados à temperatura ambiente, ao longo do tempo (h). Limite de detecção: 10 UFC/g

○ **Microrganismos Totais**

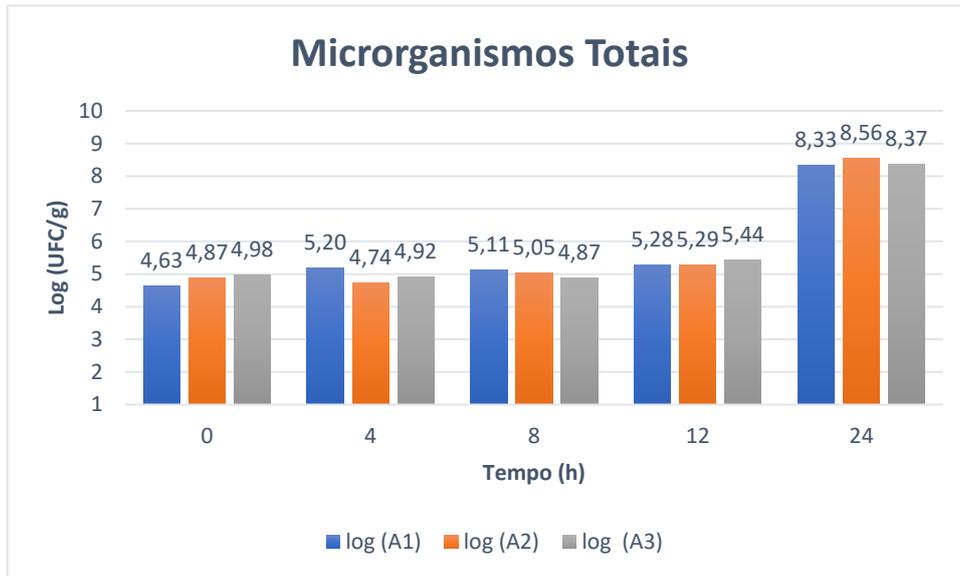


Gráfico 7: Crescimento de microrganismos totais em filetes de frango (log UFC/g), quando descongelados à temperatura ambiente, ao longo do tempo (h). Limite de detecção: 100 UFC/g

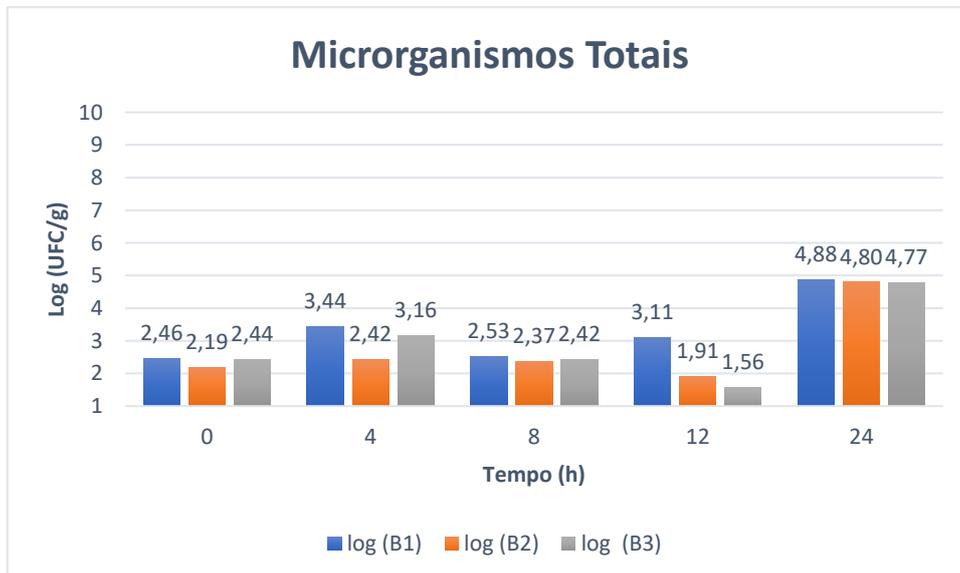


Gráfico 8: Crescimento de microrganismos totais em filetes de Pescada (log UFC/g), quando descongelados à temperatura ambiente, ao longo do tempo (h). Limite de detecção: 100 UFC/g.

Fazendo uma breve análise dos resultados obtidos para cada microrganismo em estudo.

Amostras de frango (em filetes):

Para *Enterobacteriaceae* percebemos que de t0 a t4, à temperatura ambiente, obteve-se uma carga microbiológica de aproximadamente 10^2 UFC/g (*gráfico 1*). Entre t8 e t12 a carga aumenta ligeiramente para 10^3 UFC/g (*gráfico 1*). No entanto, o aumento torna-se mais significativo 24 horas após descongelação à temperatura ambiente, passando de 10^3 UFC/g para 10^6 UFC/g (*gráfico 1*).

Analisando o gráfico correspondente às BAL, verifica-se que a quantidade de microrganismos permanece sem variações significativas entre t0 e t12, apresentando valores entre os 10^2 e 10^3 UFC/g (*gráfico 3*). Após 24 horas a descongelar nas condições em estudo, verifica-se um grande aumento na carga microbiológica, passando de valores aproximados de 10^3 UFC/g para 10^7 UFC/g (*gráfico 3*).

No que diz respeito às *Pseudomonas*, a carga microbiológica é praticamente constante entre t0 e t12, com valores entre 10^4 UFC/g e 10^5 UFC/g (*gráfico 5*). Após 24 horas existe um aumento significativo destes microrganismos, sendo os valores obtidos de 10^8 UFC/g (*gráfico 5*).

Relativamente aos microrganismos totais, verificou-se desde t0 uma carga microbiológica, de 10^5 UFC/g (*gráfico 7*), este padrão mantém-se até t12. Após 24 horas sujeitos às condições em estudo, observa-se um aumento significativo, passando de 10^5 UFC/g para 10^8 UFC/g (*gráfico 7*).

Amostras de pescada (em filetes):

Para *Enterobacteriaceae* (*gráfico 2*), BAL (*gráfico 4*) e *Pseudomonas* (*gráfico 6*), não existiu contagem destes microrganismos em t0, t4, t8 e t12 após descongelação a temperatura ambiente (*gráfico 2,4,6*). O seu aparecimento apenas se verificou após 24 horas, apresentando valores de 10^3 UFC/g para *Enterobacteriaceae* e BAL.

Nas *Pseudomonas*, 24 horas após descongelação à temperatura ambiente a carga microbiológica passa de zero para 10^4 e 10^5 UFC/g (*gráfico 6*). Relativamente aos microrganismos totais, verificou-se uma carga microbiológica de 10^2 UFC/g e 10^3 UFC/g,

mantendo-se estes valores até 12 horas após descongelação a temperatura ambiente (*gráfico 8*). Após 24 horas sob as condições em estudo, a carga aumenta para 10^5 UFC/g (*gráfico 8*).

VI. Discussão

Os dados obtidos no presente trabalho laboratorial, permitem comparar os valores obtidos de microrganismos causadores de degradação, com a bibliografia existente, tentando validar ou reestruturar os procedimentos internos da empresa onde decorreu o estágio.

Assumindo que se consideram aceitáveis valores de 10^7 UFC/g para *Enterobacteriaceae* presentes nas amostras de carne, os valores obtidos de 10^6 UFC/g durante 24 horas (*gráfico 1*), encontram-se ainda aceitáveis, no que toca à qualidade do produto (ICMSF, n.d.). Relativamente às amostras de peixe, Popovic et al. sugerem valores aceitáveis de 10^2 UFC/g para *Enterobacteriaceae* (Popovic et al., 2010). Este valor é inferior aos valores obtidos de 10^3 UFC/g (*gráfico 2*) para uma das amostras em t24.

Como demonstrado anteriormente, pelo levantamento bibliográfico, as BAL são um ótimo indicador de frescura alimentar. Sendo assim, se a razão entre os microrganismos totais (CAM) e as BAL for inferior a 100, a qualidade do produto não é colocada em causa (INSA, 2019). No presente estudo, esta razão CAM/ BAL, é inferior a 100 para as amostras de carne (*gráfico 3*). Já para as amostras de peixe (*gráfico 4*), a razão é 100 em t24, tornando o nível de frescura das amostras não aceitável, de acordo com a bibliografia (INSA, 2019).

Para *Pseudomonas*, Thorneley et al. (1960), consideram que produtos cárneos ainda se encontram aceitáveis, em termos de frescura, com valores 10^7 UFC/g (Allen et al., 1997; Cox, 2001; Mehryar, 2005; Thornley et al., 1960). Assim, através da análise do gráfico 5, observamos que este valor é ultrapassado em t24, obtendo-se valores de 10^8 UFC/g. Para o mesmo microrganismo, mas analisando as amostras de peixe, os estudos apontam para valores admissíveis de 10^6 UFC/g (GSO 1016/2015 (E), 2015). No presente estudo, de t0 a t12 não se identificaram estes microrganismos. No entanto, em t24 contabilizaram-se valores de 10^4 e 10^5 UFC/g (*gráfico 6*), indo ao encontro do sugerido pela bibliografia existente (GSO 1016/2015 (E), 2015)

Os dados obtidos para CAM nas amostras de carne, entre o t0 e t12, rondam os 10^5 UFC/g (*gráfico 4*), valor que suporta a bibliografia, que considera aceitável para este parâmetro valores de 10^6 UFC/g (GSO 1016/2015 (E), 2015; Ministry of Health, 1995; Rezende et al., 2020). Já 24 horas sob as condições em estudo, os valores apontam para os 10^8 UFC/g (*gráfico 7*), ultrapassando os valores obtidos nos estudos bibliográficos (GSO 1016/2015 (E), 2015;

Ministry of Health, 1995). Para o peixe, os valores encontrados de 10^4 UFC/g (*gráfico 8*) 24 horas após descongelação à temperatura ambiente são inferiores ao limite aceitável de 10^6 UFC/g (GSO 1016/2015 (E), 2015; Ministry of Health, 1995)

Importa referir que o peixe, apesar de mais sensível à degradação do que a carne, apresentou valores de qualidade aceitáveis para *Pseudomonas* e CAM. Isto pode ser justificado pelo processo tecnológico inerente ao fabrico do produto. Após análise da Ficha Técnica (FT) emitida pelo fornecedor, percebemos que o produto é congelado em alto-mar e sofre vidragem peça a peça, ou seja, é higienizado peça a peça. O processo de vidragem caracteriza-se pelo mergulho do pescado, uma ou mais vezes, já congelado durante um período (segundos ou minutos), criando-se uma película de água sobre a peça de pescado, que a protege de danos físicos ou contaminações (Almeida, 2016).

Em suma, e tal como já referido ao longo da presente discussão, os resultados obtidos permitem concluir que a descongelação deve ser feita em ambiente refrigerado para que a qualidade do produto seja preservada, tanto a nível organolético como microbiológico (Loureiro, 2009). No entanto, e de acordo com os resultados do presente estudo, as amostras, quando descongeladas a temperatura ambiente, apresentam valores aceitáveis para *Enterobacteriaceae* em t24 para as amostras de carne e em t12 para as amostras de peixe. Relativamente às BAL, os parâmetros encontram-se aceitáveis até t24 para as amostras de carne e em t12 para as amostras de peixe. Em relação às *Pseudomonas* os valores vão de encontro ao recomendável até ao tempo t12 para os produtos cárneos e t24 para o peixe. Para CAM, as amostras de carne revelam-se com níveis aceitáveis para o parâmetro da qualidade até 12h, já nas amostras de peixe em t24 os valores vão ao encontro do recomendável.

VII. Conclusões

Os resultados obtidos e a pesquisa bibliográfica realizada no decorrer deste estudo permitiram concluir que:

- ✓ A descongelção até 12 horas à temperatura ambiente, não demonstra ter um impacto significativo na qualidade do produto. No entanto, 24 horas após descongelção à temperatura ambiente, os valores obtidos ultrapassam os recomendados na bibliografia existente, para *Enterobacteriaceae* e BAL nas amostras de peixe, e para *Pseudomonas* e CAM, nas amostras de carne.
- ✓ Contrariamente ao esperado, o peixe não se revelou tão sensível à degradação quando comparado com a carne, uma vez que apresentou valores aceitáveis para dois dos quatro parâmetros analisados. Isto poderá estar relacionado com o tratamento tecnológico aplicado para melhorar a sua conservação (adição de água de vidragem), que acaba por proteger de forma significativa das contaminações.
- ✓ Tal como sugerido pela bibliografia, a descongelção deve ser realizada a temperaturas de refrigeração. No entanto, de acordo com os resultados obtidos no estudo, até 12h a descongelar à temperatura ambiente, os produtos analisados encontram-se aceitáveis para o parâmetro da qualidade.

VIII. Trabalhos Futuros

Durante a realização do presente trabalho foi possível identificar algumas temáticas que merecem uma reflexão mais aprofundada e uma investigação futura:

- I. Avaliar o comportamento dos microrganismos quando sujeitos a flutuações de temperatura, tentando aproximar as condições do estudo da realidade das unidades de restauração, que acabam por retirar o produto da rede de frio para preparação, voltando a conservá-lo em refrigeração;
- II. Comparar o comportamento microbiológico do presente estudo, com o comportamento microbiológico para amostras sujeitas à descongelação em ambiente refrigerado;
- III. Complementar o estudo com análises sensoriais nas diferentes fases, de forma a ajustar, de uma forma mais sustentada, os limites máximos aceitáveis (a nível da qualidade organoléptica) para cada tipo de microrganismo.

Para além disto, foi possível identificar algumas limitações, que merecem ser tidas em consideração para eventuais trabalhos futuros e que serão enumeradas de seguida:

- ✓ Não foi possível monitorizar a temperatura do produto ao longo do processo de descongelação;

IX. Bibliografia

- Abgrall, M., & Misner, S. (1998). Food Safety, Preparation and Storage Tips. Time and Temperature Make a Difference. *Cooperative Extension, College of Agriculture and Life Sciences, The University of Arizona*. .
- Adams, M., & Moss, M. (2000). *Food Microbiology* (The Royal Society of Chemistry, Ed.; 2nd ed.).
- AHRESP - Associação da Hotelaria, R. e S. de P. (2015). Código de boas práticas de higiene e segurança alimentar para a pequena restauração e bebidas. In *Código de boas práticas de higiene e segurança alimentar para a pequena restauração e bebidas*.
- Alcantara, M. de, Morais, I. C. L. de, & Souza, C. de M. O. da C. C. de. (2012). Principal Microorganisms involved in the decay of sensory characteristics of meat products. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, *6*(1), 1–20. <https://doi.org/10.5935/1981-2965.20120001>
- Alizadeh, E., Chapleau, N., de Lamballerie, M., & LeBail, A. (2007). Effects of freezing and thawing processes on the quality of atlantic salmon (*salmo salar*) fillets. *Journal of Food Science*.
- Allen, C. D., Russell, S. M., & Fletcher, D. L. (1997). *The relationship of broiler breast meat color and ph to shelf life and odor development*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119406470>
- Almeida, I. (2016). *Controlo da Qualidade Alimentar e Gestão Industrial numa Indústria de Pescado Congelado*. Instituto Politécnico de Coimbra.
- Archer, D. L. (2004). Freezing: an underutilized food safety technology? *International Journal of Food Microbiology*, *90*, 127–138.
- Associação Portuguesa de Nutrição. (2018). *Segurança Alimentar: Princípios Básicos*.
- Bio Rad. (n.d.). *RAPID'Enterobacteriaceae Agar- User Guide*.
- Biokar diagnostics. (2017). *Ágar MRS- Enumeração de Bactérias Lácticas*. www.biokar-diagnostics.com
- Biokar diagnostics. (2020). *Ágar para contagem total (PCA) (2003rd ed.)*. www.biokar-diagnostics.com
- Colla, L. M., & Prentice-Hernández, C. (2003). *Congelamento e Descongelamento - Influência sobre os alimentos*. 53–66.
- Contreras-Guzmán, E. (1994). *Bioquímica de pescados e derivados*. (Jaboticabal: Funep, Ed.).
- Costa, H. (2010). *Cadeia de frio e segurança alimentar- Controlo estatístico da temperatura*. Universidade dos Açores.
- Cox, N. A. et al. (2001). Spoilage odors in poultry meat produced by pigmented and nonpigmented *Pseudomonas*. *Poultry Science Association*. <https://doi.org/10.3382/ps.0542001>
- Cunha, M. (2017). *Execução de ensaios microbiológicos nas áreas alimentar, ambiental e técnica em contexto empresarial* [Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar]. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Environmental Health Australia. (2001). *Guidelines for the microbiological examination of ready-to-eat foods*. <https://www.eh.org.au/documents>

- Esteves, P., Macedo, S., Luz, C., Soares, P., & Vaz de Almeida, M. D. (2002). *Manual de Higiene e Segurança Alimentar*.
- Eurest. (n.d.). Retrieved April 5, 2020, from <https://www.eurest.pt/>
- F. J. M. Smulders. (1986). Sensory meat quality and its assessment, *Veterinary Quarterly*. *Veterinary Quarterly*, 158–167. <https://doi.org/10.1080/01652176.1986.9694035>
- Feitosa, T. (1999). *Contaminação, conservação e alteração da carne* (CNPAT, Ed.).
- Fellows, P. (2000). *Food Processing Technology: Principles and Practice* (2nd ed.). Woodhead Publishing Books.
- Frescura, R., Pires, C. C., Silva, J., Müller, L., Cardoso, A., Kippert, C. J., Neto, D. P., Silveira, C., Alebrante, L., & Thomas, L. (2005). Evaluation of Carcass Cuttings Proportion, Meat Characteristics and Evaluation of Live Weight Components of Lambs. *R. Bras. Zootec.*, **v.34**, n.1, p.167-174, 2005, 1995, 167–174. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982005000100021>
- Garbutt, J. (1997). *Essentials of food microbiology*. Arnold, Hodder Headline plc.
- Gonçalves, S. (2009). *Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicionalmente e do ambiente fabril*. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária.
- GSO 1016/2015 (E). (2015). *Microbiological Criteria For Food*.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation Meat and Meat Products. In *Mear Science* (Vol. 49, Issue 0). ELSEVIER.
- ICMSF. (n.d.). *Micro Organisms In Foods 2 Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*.
- INSA. (2019). *Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: valores-guia*. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5610>
- Instituto nacional del frio. (1990). *Alimentos congelados, procesado y distribucion* (S. A. Editorial Acribia, Ed.).
- ISO//TC 34. (2013). *Microbiology of food and animal feeding stuffs-General requirements and guidance for microbiological examinations- ISO 7218:2007*. www.iso.org/patents.
- Jay, J. M., Loessner, M. J. e Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7th ed.).
- Loureiro, M. (2009). *Código de Boas Práticas de Segurança Alimentar (HACCP) na Restauração Temporária*. Escola Superior Agrária de Coimbra.
- Manso Rodrigues, A. M. (2013). *Determinação dos tempos de descongelação e das percentagens de água de vidragem de várias espécies de pescado*. Instituto Politécnico de Coimbra.
- Mehyar, G. et al. (2005). al. Effectiveness of trisodium phosphate, lactic acid and commercial antimicrobials against pathogenic bacteria on chicken skin. *Food Protection Trends*.
- Ministry of Health. (1995). *Microbiological Reference Criteria For Food*. Food Administration Manual.

- Mossel, D. A. A., & Moreno Garcia, B. (1995). *Microbiologia de los alimentos - Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*.
- Moura, F. (2016). *Avaliação dos Fatores de Risco de Saladas Embaladas Prontas para Consumir*.
- Nicolau, P. (2014). *Microorganismos e crescimento microbiano*.
- Parlamento e Conselho Europeu. (2004). Regulamento (CE) N.º 852/2004. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 2002, 139–193. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:PT:PDF>
- Pereira, N., & Ávila, H. (2015). As novas tecnologias no desenvolvimento da restauração coletiva. *Acta Portuguesa de Nutrição*.
- Popovic, N., Skukan, A., Dzidara, P., Coz-Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I., Kozacinski, L., Jadan, M., & Brlek-Gorski, D. (2010). Microbiological quality of marketed fresh and frozen seafood caught off the Adriatic coast of Croatia. *Veterinarni Medicina*.
- Rainho de Almeida, A. (2013). *Metodologia CHAC em unidades Hoteleiras e de Restauração e Bebidas*. Instituto Politécnico de Coimbra.
- Rezende, C. L., Castania, V. de P., Lago, N. C. M. de R., Marchi, P. G. F. de, Araújo, D. S. de S., Messias, C. T., & Silva, L. A. (2020). Comparison of the microbiological quality of grinded meat after repeating freezing and defrosting processes. *Brazilian Journal of Development*, 6(12), 102681–102690. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-674>
- Rocha, A. (2008). Conservação dos produtos ao longo do tempo- Respostas da indústria de refrigeração. *Segurança Alimentar e Qualidade Alimentar*, 33–35.
- SCF. (2002). Risk Profile on the Microbiological Contamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw, Report of the Scientific Committee on Food. (. *Scientific Committee on Food*.
- Thornley, M., Ingram, M., & Barnes, M. (1960). The effects of antibiotics and irradiation on the pseudomonas-achromobacter flora of chilled poultry. *Journal of Applied Bacteriology*.
- World Health Organization. (2009). Five Keys To Safer Food Manual Safer Food Manual. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(11), 2833–2842.