
Mestrado Integrado em Bioengenharia

***Controlo do processo de produção de leite com
chocolate***

Dissertação de Mestrado

de

Maria João de Bastos Soares Sanches Pacheco

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizada em

Lactogal Produtos Alimentares S.A., Unidade Fabril de Modivas



Orientadora na FEUP: Prof.^a Dr.^a Olga Pastor Nunes

Orientadora na Lactogal: Eng.^a Maria José Ramos



Departamento de Engenharia Química

junho de 2020

Agradecimentos

A concretização deste trabalho só foi conseguida graças à participação e apoio de algumas pessoas, às quais eu gostaria de agradecer, em particular às minhas orientadoras, Prof.^a Dr.^a Olga Pastor e Eng.^a Maria José Ramos, que numa época distinta e marcada pela pandemia mundial de Covid-19 nunca deixaram de prestar apoio e transmitir ensinamentos ao longo deste projeto.

Gostaria também de agradecer à Lactogal pela oportunidade de estagiar na unidade de Modivas, e a todas as pessoas que trabalharam comigo no laboratório, em especial à Sofia, por todo o auxílio e carinho dedicado, e ainda a todos aqueles com que me cruzei e que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto. É ainda de prezar toda a dedicação e empenho prestado pelos operadores do Almix nas amostragens realizadas diariamente.

Aos meus colegas de Bioengenharia, em particular à Rita, ao Tiago e à Inês, fica um agradecimento especial, por todos os conselhos disponibilizados ao longo dos cinco anos desta caminhada em comum.

Às minhas amigas que me acompanham desde sempre, por todo o carinho e momentos vividos. A toda a minha família, em especial aos meus pais, por toda a paciência prestada e por me apoiarem ao longo da minha vida, proporcionando a minha evolução, tanto pessoal como académica. Por último, gostaria de agradecer ao meu namorado por todo o apoio e carinho oferecido, que apesar de longe, esteve sempre presente, auxiliando-me em tudo o que estava ao seu alcance.

Resumo

O leite apresenta uma microbiota rica, útil na produção de diversos produtos como queijo, iogurte e manteiga. Decorrente do seu elevado valor nutricional e da sua microbiota, é considerado um produto altamente perecível. No sentido de o tornar seguro para o consumidor e assegurar a sua conservação recorre-se a tratamentos e tecnologias adequadas. Na medida em que certos organismos sobrevivem ao processo de tratamento do leite e carecem de avaliação, é necessário otimizar o processo e identificar os possíveis causadores do seu crescimento, garantindo a qualidade e segurança do produto final. Assim, o principal objetivo deste trabalho centra-se na deteção do(s) ponto(s) crítico(s) de controlo no processo de produção do leite com chocolate da marca Lactogal.

A análise da variação microbiana foi estudada quanto à flora aeróbia mesófila (FAM) e termófila (FAT) e aos esporos aeróbios termorresistentes mesófilos (EATM) e termófilos (EATT). Em média, a FAM apresentou valores de UFC/mL superiores aos restantes grupos (entre 10^4 e 10^6 UFC/mL), tendo sido registado para as amostras de leite proveniente dos tanques de leite recuperado os valores mais elevados. EATM e EATT apresentaram contagens na ordem de 10^{-1} e 10^1 UFC/mL. Para FAT, as contagens variaram na ordem de 10^1 e 10^3 UFC/mL. Para FAM e EATM verificaram-se contagens inferiores no leite termizado em relação às obtidas no leite recuperado pronto, isto deve-se ao facto de haver um volume superior de leite cru termizado, em comparação com o leite recuperado pronto, no tanque termizado, e de este apresentar uma carga microbiana inferior à registada para o leite recuperado pronto, ocorrendo assim um efeito de diluição no tanque termizado. As contagens de UFC/mL, para EATT e EATM, foram superiores, em média, no leite recuperado pronto, em relação ao leite recuperado, possivelmente devido à adição de leite em pó ao leite recuperado, podendo este conter esporos de bactérias termorresistentes. EATM apresentou também contagens elevadas, em média, na mistura de leite termizado com os ingredientes desidratados, que poderão estar associados à presença de esporos. Pela análise da carga microbiana das amostras obtidas ao longo da produção e da carga de células viáveis obtidas por citometria de fluxo para o produto final, constatou-se que o processo UHT é bastante eficiente na eliminação de organismos. Apesar disso, a carga microbiana contabilizada ao longo da produção parece não ter uma relação na carga de células viáveis no produto final. O leite recuperado incorporado em cada produção apresentou um impacto na carga microbiana do leite com chocolate para FAM e FAT. Por outro lado, o tempo não tem influência na variação da carga microbiana do leite. Assim, os principais pontos críticos do processo foram a adição de ingredientes desidratados (como leite em pó e cacau), a percentagem de leite recuperado incorporada e o processo de termização.

Palavras Chave: leite com chocolate, microbiologia, pontos críticos, tempo e leite recuperado.

Abstract

Milk has a rich microbiota, useful in the production of various products, such as cheese, yogurt and butter. Due to its high nutritional value and its microbiota, it is considered a highly perishable product. In order to make it safe for the consumer and to protect its conservation, several resources and technologies are used. However, certain organisms survive the milk treatment process, requiring assessment and detection, in order to optimize the process, and to identify possible causes of growth of microorganisms, ensuring the quality and safety of the final product. Thus, the main objective of this work focuses on the detection of critical control point(s) in the production process of chocolate milk from the brand Lactogal.

An analysis of microbial variation was studied for aerobic mesophilic (FAM) and thermophilic (FAT) flora and thermophilic mesophilic (EATM) and thermophilic (EATT) aerobic spores. On average, FAM has registered values of CFU/mL higher than the other groups (between 10^4 and 10^6 CFU/mL), having been registered for samples of recovered milk from the milk tanks with the highest values. EATM and EATT had the lowest microbial content in relation to the other groups, in the order of 10^{-1} and 10^1 CFU/mL. For FAT, the counts varied between 10^1 and 10^3 CFU/mL. For FAM and EATM, there were lower counts in thermised milk compared to those obtained in thermised recovered milk. This is due to the fact that there is a higher volume of thermised raw milk, compared to the thermised recovered milk, in the thermised tank, and because it presents a microbial content lower than the registered for the recovered ready milk, which leads to a dilution effect in the thermised tank. The counts of CFU/mL, for EATT and EATM, on average, were higher in the recovered ready milk, in relation to the recovered milk, possibly due to the addition of powdered milk to the recovered milk, which may eventually contain thermoresistant bacteria spores. EATM has also shown, on average, high counts, in the mixture of thermised milk with dehydrated ingredients, which may be associated with the presence of spores of thermoresistant bacteria. By analyzing the microbial content of samples obtained during production and the content of viable cells obtained by cytometry flow for the final product, it was verified that the UHT process is quite efficient in eliminating organisms. Despite this, the microbial content accounted for during production does not seem to have a relationship with the content of viable cells in the final product. The recovered milk incorporated in each production had an impact on the microbial content of chocolate milk for FAM and FAT. On the other hand, time seems to have no influence on the variation in the microbial milk content. Thus, the main critical points of the process were the addition of dehydrated ingredients (such as powdered milk and cocoa), the percentage of recovered milk incorporated and the thermization process.

Keywords: chocolate milk, microbiology, critical points, time and recovered milk.

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.



(Maria João de Bastos Soares Sanches Pacheco)

Porto, 29 de junho de 2020

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Apresentação da Empresa.....	2
1.3	Contributos do Trabalho.....	3
1.4	Objetivos do Trabalho	3
2	Contexto e Estado da Arte	5
2.1	Composição química do leite	5
2.2	Microbiologia do leite (composição, produção e principais fatores contaminantes). ..	8
2.3	Tratamento térmico do leite	11
2.4	Processo de produção na Lactogal	13
	2.4.1 Produção de leite achocolatado com leite recuperado	17
3	Materiais e Métodos	19
3.1	Materiais	19
3.2	Métodos	20
	3.2.1 Local e método de colheita das amostras de leite.....	20
	3.2.2 Caracterização microbiológica do leite nas várias etapas do processo de produção de leite com chocolate e análise do produto final	21
	3.2.2.1 Flora aeróbia mesófila e flora aeróbia termófila.....	22
	3.2.2.2 Flora aeróbia termorresistente mesófila e termófila	23
	3.2.2.3 Caracterização microbiológica do produto final.....	24
	3.2.2.3.1 Enumeração das células viáveis totais - Método automático (D-count®)	24
	3.2.2.3.2 Detecção e enumeração de células cultiváveis (provas de estufa)	24
	3.2.2.3.3 Determinação do pH	26
	3.2.2.4 Resumo das análises realizadas às amostras e produto final.....	26
	3.2.3 Método de cálculo para variação de contagens	27
	3.2.4 Análise estatística	27
4	Resultados e Discussão.....	29
4.1	Avaliação da variação microbiológica no processo de produção de leite	29

4.2	Comparação entre a variação microbiológica das amostras e dos pacotes	34
4.3	Avaliação da influência de fatores que afetam a variação microbiológica do leite com chocolate	40
4.3.1	Tempo no processo de produção de leite UHT	40
4.3.2	Percentagem de leite recuperado no processo de produção de leite UHT	43
5	Conclusões.....	45
6	Avaliação do trabalho realizado	47
6.1	Objetivos Realizados	47
6.2	Limitações e Trabalho Futuro.....	47
6.3	Apreciação Final	47
	Referências.....	49
	ANEXOS	53
	Anexo I Considerações relativas aos procedimentos	55
	Anexo II Dados relativos às amostras.....	57
	Anexo III Dados relativos aos pacotes.....	65
	Anexo IV Dados microbiológicos vs dados temporais	67

Lista de Figuras

<i>Figura 1. Lactogal, unidade fabril de Modivas. Retirado de Proleite (2017)</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2. Constituintes do leite. Adaptado de Ramesh et al. (2015)</i>	<i>7</i>
<i>Figura 3. Crescimento microbiano em função do tempo e temperatura. Adaptado de Bylund (1995). .9</i>	
<i>Figura 4. Relação entre os efeitos de esterilização e o escurecimento. A linha A representa o limite inferior de combinações de tempo/temperatura que faz com que o leite fique escurecido. A linha B é o limite inferior de combinações para esterilização completa (destruição de esporos termófilos). Adaptado de Bylund (1995)</i>	<i>13</i>
<i>Figura 5. Esquematização do processo de produção de leite na Lactogal, desde a sua receção na fábrica até à distribuição para o mercado.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 6. Constituição das embalagens da Tetra Pak. Adaptado de Tetra Pak International S.A. (n.d.).</i>	<i>16</i>
<i>Figura 7. Esquematização do processo de produção e respetivo local de recolha de amostras de leite UHT. O processo encontra-se descrito na seção introdução. As letras de A a I referem-se aos locais de colheita de amostras (ver secção 3.2.1).....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 8. Esquematização exemplificativa do método de referência utilizado para a análise da flora aeróbia mesófila à amostra I. As amostras encontram-se enumeradas no subcapítulo 3.2.1. As placas foram incubadas a 30 ± 1 °C durante 3 dias.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 9. Esquematização exemplificativa do método de referência utilizado para a análise da flora aeróbia termófila à amostra I. As amostras encontram-se enumeradas no subcapítulo 3.2.1. As placas foram incubadas a 55 ± 1 °C durante 3 dias.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 10. Esquematização exemplificativa do método utilizado para a análise da flora aeróbia termorresistente à amostra I. As amostras encontram-se enumeradas no subcapítulo 3.2.1. As placas foram incubadas durante 3 dias a 30 ± 1 °C (EATM) e 55 ± 1 °C (EATT).</i>	<i>23</i>
<i>Figura 11. Equipamento D-count® com a respetiva ampliação da zona da análise e identificação dos reagentes/soluções e amostras a analisar. A legenda atribuída a cada letra encontra-se ao longo do texto.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 12. Esquematização das análises realizadas ao produto final, incluindo os dois métodos utilizados - tradicional e automático. Todo o procedimento foi realizado na câmara de fluxo, cuja esterilidade foi avaliada.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 13. Sistematização gráfica das UFC/mL obtidas para os grupos microbianos em estudo. Os resultados obtidos para cada amostra são a média dos valores obtidos para essa mesma amostra em cada produção. Analisaram-se 5 amostras A para FAM e 6 amostras B, C, D, E e F, para todos os grupos microbianos. As amostras G, H e I são resultado da média de UFC/mL correspondentes aos vários lotes</i>	

<i>existentes em cada produção, tendo sido analisado um total de 17 amostras para cada G, H e I, para cada categoria microbiana.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 14. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 1. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 15. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 2. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 16. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 3. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 17. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 4. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 18. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 5. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 19. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 6. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 20. Gráficos representativos da correlação entre o tempo de produção das amostras G (C-G) e os Log UFC/mL das amostras G em estudo, para os 4 grupos microbianos.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 21. Gráficos representativos da correlação entre o tempo de produção das amostras H (C-H) e os Log UFC/mL das amostras H em estudo, para os 4 grupos microbianos.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 22. Gráficos representativos da correlação entre o tempo de produção das amostras I (C-I) e os Log UFC/mL das amostras I em estudo, para os 4 grupos microbianos.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 23. Gráficos representativos da correlação entre a percentagem de leite recuperado e os Log UFC/mL das amostras I em estudo, para os 4 grupos microbianos.</i>	<i>44</i>
<i>Figura I. 1. Esquematização do procedimento de diluições sucessivas utilizando solução de Ringer. ...</i>	<i>56</i>
<i>Figura I. 2. Esquematização do método de inoculação por estriamento realizado no produto final. ...</i>	<i>56</i>

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1. Características físico-químicas do leite de vaca. Adaptado de Ramesh et al. (2015)</i>	<i>5</i>
<i>Tabela 2. Tabela resumo com os principais microrganismos nocivos (deteriorantes e patogénicos) e exemplos associados. Adaptado de Ramesh et al. (2015).</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 3. Meios de cultura utilizados ao longo do estudo desenvolvido.</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 4. Materiais utilizados ao longo da atividade experimental.</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 5. Diluições utilizadas para as amostras de leite consoante a caracterização microbiológica em estudo.</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 6. Métodos de referência utilizados para o produto (diluição e incorporação em agar e método de estriamento). O tempo de incubação das placas e dos tubos de ensaio é 3 dias e a temperatura é determinada pela temperatura a que o pacote foi incubado. O D - Count® permite a obtenção necessária a incubação de amostras.</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 7. Contagem de células viáveis/mL no produto final por citometria de fluxo, para diferentes períodos de incubação. O limite de deteção é 1 célula viável por mL.</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 8. Volume de leite recuperado (E) e percentagem de leite recuperado incorporado em cada produção.</i>	<i>44</i>
<i>Tabela II. 1. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 1.</i>	<i>57</i>
<i>Tabela II. 2. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 2.</i>	<i>57</i>
<i>Tabela II. 3. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 3.</i>	<i>58</i>
<i>Tabela II. 4. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 4.</i>	<i>58</i>
<i>Tabela II. 5. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 5.</i>	<i>59</i>
<i>Tabela II. 6. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 6.</i>	<i>59</i>
<i>Tabela II. 7. Média dos valores de UFC/mL obtidos para as seis produções e respetivos desvios-padrão (DP).</i>	<i>60</i>
<i>Tabela II. 8. Valores de UFC/mL abaixo do limite de deteção.</i>	<i>60</i>
<i>Tabela II. 9. Dados relativos às amostras recolhidas ao longo do processo de produção, entre eles, identificação (ID), data e hora de colheita, tanque, lote e temperatura do leite no interior do tanque (T).</i>	<i>62</i>
<i>Tabela III. 1. Dados relativos aos pacotes, onde a identificação do pacote é representada por ID.</i>	<i>65</i>
<i>Tabela III. 2. Resultados das provas de estufa obtidos para cada pacote, identificados pelas letras de P a U (ID), utilizando o método de referência.</i>	<i>66</i>

<i>Tabela IV. 1. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (1, 4 e 5) da produção 1 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.</i>	<i>67</i>
<i>Tabela IV. 2. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (1, 4 e 5) da produção 2 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.</i>	<i>67</i>
<i>Tabela IV. 3. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (1, 2 e 3) da produção 3 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.</i>	<i>68</i>
<i>Tabela IV. 4. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (3 e 6) da produção 4 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.</i>	<i>68</i>
<i>Tabela IV. 5. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (1,2 e 5) da produção 5 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.</i>	<i>69</i>
<i>Tabela IV. 6. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (4, 5 e 6) da produção 6 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.</i>	<i>69</i>

Glossário

Lista de Siglas e Acrónimos

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IFS	<i>International Food Standard</i>
FSC	<i>Forest Stewardship Council</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
UFC	Unidade Formadora de Colónias
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
Alip	Associação Interprofissional do Leite e Lacticínios
MPCA	<i>Milk Plate Count Agar</i>
RCA	<i>Reinforced Clostridial Agar</i>
FAM	Flora Aeróbia Mesófila
FAT	Flora Aeróbia Termófila
EATM	Flora Aeróbia Termorresistente Mesófila
EATT	Flora Aeróbia Termorresistente Termófila
CIP	<i>Clean- In -Place</i>

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

O leite tem sido consumido pelos seres humanos desde os tempos pré-históricos e, nos dias de hoje, continua a ser a base da economia da maioria das nações (Mesfine et al., 2015). Atualmente, constitui um componente essencial na dieta de aproximadamente 6 biliões de pessoas (FAO, 2020b). Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), no ano de 2019, registou-se uma produção mundial de leite de 852 milhões de toneladas, sendo a Ásia a maior região produtora, seguida pela Europa (FAO, 2020a). Estima-se que o consumo mundial *per capita* de produtos láteos frescos deverá aumentar em 1,0% por ano na próxima década, impulsionado pelo maior crescimento da renda *per capita* (OECD & FAO, 2019).

O leite apresenta um valor nutricional elevado e é um dos poucos alimentos consumidos sem processamento adicional, sendo geralmente considerado o alimento mais perfeito (Ramesh et al., 2015). Através do seu processamento é possível produzir diversos outros produtos, usando-o como ingrediente principal, por exemplo queijo, iogurte e manteiga, ou secundário como em doces e pão (Ramesh et al., 2015). Associado ao seu consumo há uma aquisição de macro e micronutrientes; estando presentes no leite 18 dos 22 nutrientes essenciais, incluindo cálcio, fósforo e vitamina D (Michaëlsson et al., 2014). Apesar disso, há que ter em conta a biodisponibilidade nutricional, na medida em que apenas uma parte do que é ingerido é realmente absorvido pelo organismo (Caroli et al., 2011; Kwak et al., 2012). Estudos recentes apontam que, em adultos, a ingestão de produtos láteos evidencia melhorias na composição corporal e facilita a perda de peso na restrição energética, incitada pela presença de cálcio, vitamina D e proteínas nos laticínios (Kung et al., 2018; Thorning et al., 2016). Além do mais, o consumo de leite foi também associado a um risco neutro ou reduzido de diabetes tipo 2 e a um risco reduzido de doenças cardiovasculares (Thorning et al., 2016), embora durante anos se tenha pensado o oposto, apontando a elevada proporção de gordura saturada que o leite apresenta como fator determinante. No entanto, artigos recentes provam o oposto através da seguinte evidência: o leite é fortemente desnatado (Kung et al., 2018). Para além das vantagens apresentadas existem ainda outras, como por exemplo a redução do risco de obesidade em crianças e a relação inversa entre a ingestão de leite e o aparecimento de cancro (colorretal, da bexiga, gástrico e mamário) (Thorning et al., 2016).

Decorrente do elevado valor nutricional, da composição química e da microbiota natural, o leite é considerado um produto altamente perecível. A grande maioria dos microrganismos associados ao leite e produtos láteos são bactérias. Além disso, os fungos são importantes na deterioração de certos produtos láteos. Em menor grau, o leite é também um

vetor potencial para a transmissão de protozoários parasitas, vírus e algas (Ramesh et al., 2015). Assim, de forma a torná-lo seguro para o consumidor e assegurar a sua conservação, é necessário recorrer a tratamentos e tecnologias adequadas.

Devido à possibilidade de sobrevivência de organismos ao processo de tratamento do leite, há uma necessidade de avaliá-los, nas várias etapas, com o objetivo não só de otimizar o processo de produção detetando possíveis causadores do aparecimento/crescimento de microrganismos, bem como de garantir a qualidade e segurança do produto final, evitando que seja nocivo para a saúde do consumidor. Nesse sentido, a Lactogal Produtos Alimentares S.A., no seu laboratório de microbiologia, realiza diariamente análises para detetar a presença de microrganismos mesófilos, termófilos e termorresistentes no final do processo de produção, por métodos de referência dependentes (método de espalhamento em placa e estriamento) e independentes (citometria de fluxo) de cultura. Em suma, neste estudo foi feito um acompanhamento das diversas etapas da produção de leite com chocolate para compreender quais as mais propícias ao aparecimento/desenvolvimento de organismos, avaliando assim possíveis fatores como o tempo de produção e a percentagem de leite recuperado utilizada.

1.2 Apresentação da Empresa

Em 1996, com a fusão das Cooperativa Agros, Cooperativa Lacticoop e Proleite/Mimosa S.A. surgiu a Lactogal Produtos Alimentares S.A. Esta sociedade tem como principal objetivo a produção e comercialização de leite e seus derivados. Para tal, atua de forma abrangente no contexto da globalização do mercado láteo, criando valor e contribuindo para a criação de condições de produção de leite em Portugal. Neste momento, em Portugal continental, a Lactogal conta com três unidades fabris localizadas na Tocha, em Vila do Conde (Figura 1) e em Oliveira de Azeméis e oito delegações comerciais espalhadas ao longo do país. Regista-se também o estabelecimento de parcerias com a ilha dos Açores e Espanha (Lactogal, 2019). Segundo o relatório de responsabilidade social, publicado em 2015 pela Lactogal, verifica-se uma quota de mercado português de laticínios de 60% (Lactogal, 2015).

Atualmente, a empresa produz alimentos com os mais altos padrões de qualidade, desde leite e seus derivados (manteigas, natas, queijos, iogurtes e leites fermentados) até águas, bebidas e sumos, contando com diversas marcas patentes como a Mimosa, Agros, Matinal, Gresso, Vigor, Pleno, Adagio, Castelões, Milhafre dos Açores, Primor, Serra Dourada, Castelinhos, Serra da Penha e Fresky. Esta sociedade preza pelo equilíbrio e segurança alimentar dos consumidores, comprometendo-se com o desenvolvimento de produtos com a máxima qualidade e segurança, e procura igualmente estendê-las aos seus serviços e negócios, atuando com transparência e cooperação em todas as relações internas e externas.

Para além da segurança alimentar estar patente e incorporada nos processos de trabalho da empresa, a Lactogal encontra-se certificada ao nível da Qualidade pela ISO 9001 (Sistema de Gestão de Qualidade), bem como pelo *International Food Standard* (IFS) quanto à qualidade e segurança alimentar. Importa ainda referir que um dos principais compromissos da Lactogal passa por garantir a sustentabilidade nos contextos económico, social e ambiental. Um exemplo disso, foi a mais recente inovação da embalagem de Leite Bem Essencial Mimosa composta por 89% de matérias-primas de origem vegetal. Esta embalagem, certificada no âmbito florestal pela FSC®, é composta por polietileno de origem vegetal, fabricada a partir da cana-de-açúcar e trouxe melhorias na sustentabilidade ambiental, com a redução de 21% das emissões de dióxido de carbono (CO₂) em comparação com a embalagem anterior. Assim, a Lactogal assume o compromisso de um consumo sustentável dos recursos naturais e de energia elétrica, a minimização do tratamento e a reutilização de águas residuais, bem como a diminuição na produção de resíduos (Lactogal, 2019).



Figura 1. Lactogal, unidade fabril de Modivas. Retirado de Proleite (2017).

1.3 Contributos do Trabalho

O presente estudo permitiu determinar as variações da carga microbiana nas várias etapas do processo de produção de leite com chocolate, na tentativa de identificar o(s) motivo(s) dessas variações, tanto entre lotes como entre produções.

1.4 Objetivos do Trabalho

O principal objetivo deste trabalho consistiu na deteção do(s) ponto(s) crítico(s) de controlo no processo de produção do leite com chocolate da marca Lactogal (Mimosa e Agros), ou seja, determinar o(s) passo(s) do processo de produção com maior probabilidade de contaminação do produto final. Neste contexto, pretendeu-se ainda avaliar a influência de dois parâmetros no produto final (leite com chocolate ultrapasteurizado), o tempo de produção e a percentagem de leite recuperado.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Composição química do leite

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), o leite é uma secreção látea, praticamente isenta de colostro, obtida pela ordenha completa de uma ou mais vacas saudáveis, que pode ser clarificada e ajustada pela separação de parte da gordura. Ao leite concentrado e leite seco pode ser adicionada água, em quantidade suficiente, para os reconstituir (FDA, 2019).

O leite é maioritariamente composto por água, lípidos, proteínas, açúcares (por exemplo lactose) e minerais (Bylund, 1995). A sua composição difere entre os diferentes mamíferos e raças da mesma espécie. Além da raça de gado, o estágio de lactação, o ambiente e as práticas de alimentação parecem também influenciar a sua composição (Nickerson, 1960).

A constituição do leite de vaca é geralmente composta por 87% de água e 13% de sólidos totais, dos quais a lactose apresenta maior percentagem (cerca de 4,9%) sucedida da gordura (com 4,6%) (Bylund, 1995). Os sólidos totais são constituídos por dois grupos: a gordura e os sólidos totais sem gordura (Figura 2). Na Tabela 1 encontram-se discriminadas algumas características físico-químicas do leite de vaca.

Tabela 1. Características físico-químicas do leite de vaca. Retirado de Ramesh et al. (2015).

Características	Leite de vaca
pH	6,60
Valor tampão (pH 5,1)	$3,59 \times 10^{-2}$
Densidade a 20 °C (kg/m ³)	$1,03 \times 10^{-2}$
Viscosidade (kg/m.s)	$1,86 \times 10^3$
Acidez (%)	0,14
Tamanho do glóbulo de gordura (m)	$3,85 \times 10^{-6}$
Fosfatase (U)	83,0

A água, o elemento encontrado em maior quantidade no leite, permite a dissolução ou suspensão de todos os sólidos totais. A sua remoção possibilita a criação de produtos láteos concentrados e secos, aumentando a sua vida útil através da redução da atividade da água (Ramesh et al., 2015).

A gordura do leite é principalmente composta por triglicéridos (cerca de 98%), sendo apenas 1 a 2% de compostos minoritários como fosfolípidos, colesterol, esteroides, carotenoides e vitaminas solúveis em gordura (A, D, E e K) (substâncias associadas). A gordura verdadeira corresponde aos glicerídeos. Em regra, o leite deve conter, no mínimo, 3% de gordura de leite e 8,25% de sólidos de leite não gordura. O leite pode ser padronizado pela adição ou remoção de nata ou pela adição de leite desnatado. A gordura é a sua principal fonte de energia no leite e é composta por glóbulos com 1-20 μm de tamanho. Cada glóbulo de gordura é cercado por uma camada adsorvida de outros constituintes do leite, principalmente proteínas e fosfolípidos, conferindo estabilidade à emulsão óleo em água, evitando que a gordura se desintegre. A incorreta homogeneização do leite aquando do seu processamento, a agitação excessiva do leite cru (espuma), a ativação térmica (reaquecimento do leite cru previamente arrefecido), o arrefecimento do leite durante um longo período de tempo e o crescimento excessivo de psicrófilos, contribuem para o sabor característico a ranço nos produtos láteos, resultado da ação das lipases e consequente libertação de ácidos gordos de cadeia curta (Ramesh et al., 2015).

O grupo dos sólidos não gordura é dividido em 4 grupos: lactose, substâncias nitrogenadas, material mineral e outros. A lactose é o principal hidrato de carbono do leite e é uma boa fonte de energia, variando a sua concentração com a produção de leite entre 4,2 e 5%. Este dissacarídeo, compreende moléculas de D-galactose e D-glicose. Este açúcar confere o sabor doce ao leite, sendo apenas 25% tão doce quanto a sacarose (Ramesh et al., 2015). A lactose, como açúcar redutor, pode sofrer reações de *Maillard*. A reação mais comum observada é da lactose com o grupo ϵ -amino do resíduo de lisina das proteínas do leite (Shimamura & Uke, 2012). Esta reação é influenciada por fatores como a temperatura e o pH. Para temperaturas mais baixas, a velocidade de reação é lenta e duplica a cada aumento de 10 °C, entre 40 °C e 70 °C (Francisquini et al., 2017; Van Boekel, 1998). Para temperaturas elevadas a reação de *Maillard* confere ao leite uma cor amarelada mais intensa e um sabor caramelizado (Ramesh et al., 2015). A fermentação láctica também lhe provoca alterações, levando à sua acidificação, através da hidrólise da lactose e subsequente oxidação dos seus monómeros com produção de ácido (Guetouache et al., 2014).

As proteínas, substâncias nitrogenadas, são compostas por uma ou mais cadeias de aminoácidos interligados. O leite apresenta os aminoácidos essenciais que o organismo humano não consegue sintetizar (Guetouache et al., 2014). As proteínas são divididas em dois grupos: as proteínas séricas e as caseínas. As caseínas, insolúveis, constituem mais de 80% da proteína total no leite e são subdivididas em cinco classes principais: α -s1, α -s2, β , γ e κ -caseínas. Estas substâncias coloidais apresentam-se sob a forma de micelas de fosfocaseinato de cálcio e são facilmente degradadas por enzimas proteolíticas e na presença de ácido ocorre a sua precipitação. Contudo, as micelas de caseína são bastante termoestáveis, até a

uma temperatura de até 140 °C. As proteínas séricas são α -Lactoglobulina, β -Lactoglobulina, albumina sérica, imunoglobulinas e proteose peptonas. Estas proteínas são solúveis e termolábeis e desnaturam completamente a uma temperatura de 80 °C (Ramesh et al., 2015).

O leite apresenta uma percentagem de matéria mineral inferior a 1%, que é principalmente constituída por átomos de bicarbonato, cloretos, citratos e bicarbonatos de cálcio, magnésio, potássio e sódio (Ramesh et al., 2015). A distribuição de cálcio, citrato, magnésio e fosfato entre as fases solúvel e coloidal e a sua interação com as proteínas é capaz de conferir estabilidade ao leite, desempenhando um papel importante na organização estrutural das micelas de caseína (Guetouache et al., 2014).

Por último, podem ainda ser encontrados pigmentos, gases dissolvidos, vitaminas, enzimas e bactérias nos sólidos não gordura. As vitaminas hidrossolúveis encontradas no leite de vaca são tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6), ácido pantoténico (B5), biotina (B7), ácido fólico (B9), cobalamina (B12) e ácido ascórbico (C). Uma vez que no nosso organismo estas substâncias existem em baixas quantidades, é importante a sua ingestão. As vitaminas B são instáveis ao aquecimento e processamento, às condições o leite é normalmente submetido. Por outro lado, a concentração da Vitamina C é muito reduzida no leite, sendo a maior parte do conteúdo destruída durante a pasteurização. No que diz respeito às enzimas importantes no processo de laticínios, as principais são as lipases, as peroxidases e a catalase; estas enzimas são dependentes de fatores como a temperatura, pH e a disponibilidade de substrato. Tanto as enzimas como as bactérias estão relacionadas com o processo de degradação de constituintes originais do leite (Ramesh et al., 2015). As bactérias serão estudadas em maior detalhe na secção 2.2.

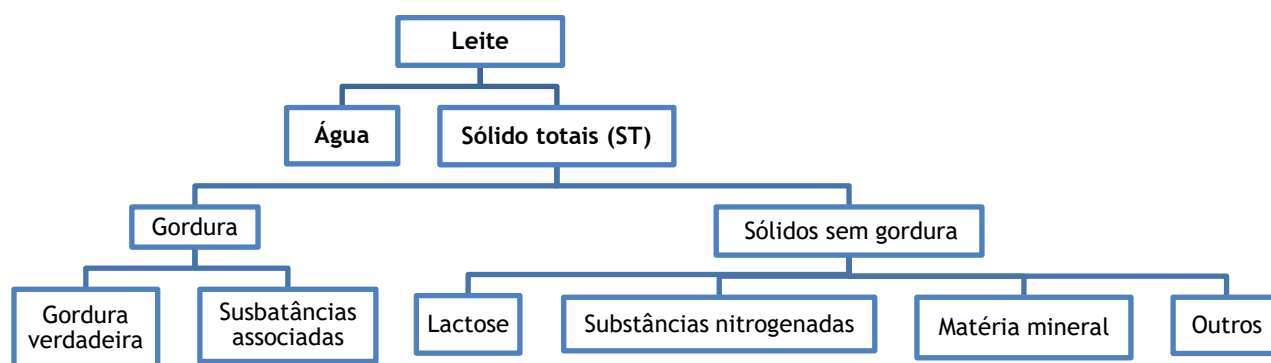


Figura 2. Constituintes do leite. Adaptado de Ramesh et al. (2015).

2.2 Microbiologia do leite (composição, produção e principais fatores contaminantes)

Existem essencialmente dois tipos de microrganismos, os **benéficos**, que transformam alimentos e os **nocivos**, que os contaminam através da sua degradação, e/ou pela produção de células patogénicas e substâncias tóxicas (Ramesh et al., 2015).

O leite é produzido pelas glândulas mamárias dos mamíferos, e é estéril quando excretado no úbere; no entanto, mesmo antes de sair é infetado por bactérias que entram pelo canal da teta, num número bastante reduzido (em animais saudáveis) (Muleta, 2016). As bactérias pertencentes à flora normal do úbere dos animais são designadas por bactérias do ácido láctico, nomeadamente *Lactococcus* sp. e *Leuconostoc* sp. (Pastor, 2017). Estas bactérias pertencem ao filo *Firmicutes* e caracterizam-se por não produzirem esporos e por fermentarem com produção de ácido. Assim, as bactérias deste grupo microbiano são classificadas segundo os produtos finais de fermentação, ou seja, produtoras de ácido láctico como produto primário de fermentação (homofermentativas) ou produtoras de outros produtos finais como ácido acético, CO₂ e outros compostos (heterofermentativas) (Ramesh et al., 2015).

Estas bactérias Gram-positivas são de extrema importância na produção de diversos produtos láteos como iogurte, queijo e manteiga. A seleção dos tipos de microrganismos utilizados é um fator importante para maximizar a qualidade dos produtos (Bylund, 1995). Bactérias como *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus* (Delgado et al., 2013) são frequentemente utilizadas na produção de queijo e iogurte (Mills et al., 2010; Parente & Cogan, 2004).

Devido ao elevado valor nutricional, o leite é extremamente suscetível à contaminação microbiológica. Esta varia quanto ao tipo e quantidade de microrganismos (Barros et al., 2011). Outros fatores determinantes são a atividade da água, luz, acidez, o oxigénio e outros que serem abaixo mencionados (Bylund, 1995). Após a saída do leite pelo úbere, está sujeito à contaminação de microrganismos provenientes de diversas fontes como: infeções (por exemplo mastite), a dieta do animal, procedimentos e práticas de ordenha, superfícies de equipamentos em contato com o leite, práticas de saneamento, práticas de refrigeração, tempo e condições de armazenamento e processamento, estações do ano e ainda fatores climáticos e geográficos (Ramesh et al., 2015).

Segundo a *International Dairy Federation* (IDF), a qualidade do leite cru pode ser avaliada pela carga microbiana, sendo que a produção de leite com contagem de placas inferior a 10⁴ unidades formadoras de colónias (UFC) por mL reflete boas práticas de higiene, enquanto que uma contagem inicial superior a 10⁴ UFC/mL é evidência de falhas na higiene da produção (IDF, 1990).

As bactérias associadas ao leite e produtos láteos são geralmente classificadas como bactérias não formadoras de esporos ou formadoras de esporos (ou esporulantes). Uma classificação adicional refere-se às suas características de resistência ao calor (por exemplo, termorresistentes e não-termorresistentes) e de refrigeração (por exemplo psicrófilos) (Ramesh et al., 2015).

É possível distinguir os microrganismos termoprresistentes de acordo com a sua temperatura ideal de crescimento. Por exemplo, os mesófilos crescem a uma temperatura ótima entre 30 e 37 °C e chegam a tolerar no máximo 50 °C, enquanto que os termófilos crescem a 55 °C (suportando um máximo de 60 °C). Geralmente, os mesófilos encontrados são bactérias formadoras ou não formadoras de esporos, como por exemplo estirpes de *Bacillus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Arthrobacter* (Gleeson et al., 2013).

Os psicrófilos crescem a uma temperatura ótima inferior a 20 °C (Gleeson et al., 2013) e toleram um máximo de 25 °C. Estes microrganismos desenvolvem-se, tipicamente, quando sujeitos a longos períodos de armazenamento a baixas temperaturas (2-6 °C); resistem também à pasteurização, através da formação de esporos. Apesar de ser aconselhado um arrefecimento rápido após a ordenha, devido a ser um dos fatores essenciais para retardar o crescimento de bactérias no leite cru (Figura 3) (Bylund, 1995) verifica-se, para períodos longos de exposição, uma influência significativa de refrigeração na composição microbiana natural. Isto é, no leite cru refrigerado, as bactérias aeróbicas mesófilas Gram-positivas dominantes são substituídas por bactérias psicrófilas Gram-negativas e Gram-positivas (Samaržija et al., 2012). Estas últimas, para além de crescerem e se multiplicarem a baixas temperaturas, têm a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas termoestáveis, muitas das quais mantêm a sua atividade após o tratamento térmico do leite (Chen et al., 2003; Cousin, 1982). Um exemplo de um microrganismo psicrófilico presente no leite é *Pseudomonas* spp (Anderson et al., 2011).

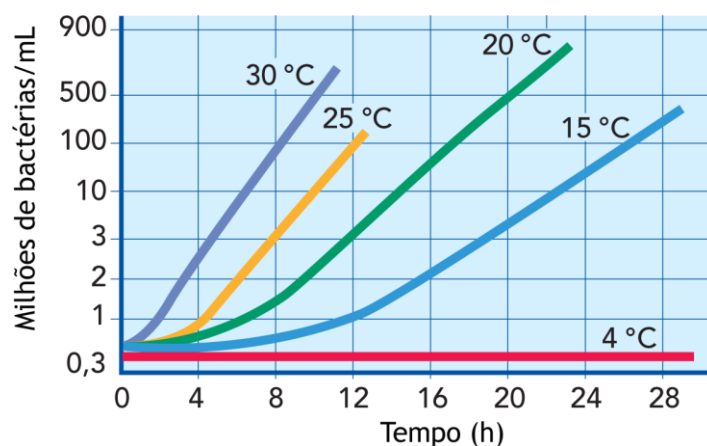


Figura 3. Crescimento microbiano em função do tempo e temperatura. Adaptado de Bylund (1995).

Estes microrganismos podem provocar a deterioração do alimento por alteração de sabor, bem como a coagulação indesejável de proteínas láteas e o aumento da concentração de ácidos gordos e aminoácidos livres. Tais alterações organoléticas e físico-químicas acarretam perdas económicas e problemas para a saúde pública, diminuindo a vida útil do leite e dos seus derivados (Zadow, 1986).

Além dos microrganismos psicrófilos, existem também outros microrganismos deteriorantes, habitualmente presentes nos laticínios como bactérias coliformes (Tabela 2) (Ramesh et al., 2015). Em particular, as bactérias *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus* spp. têm a capacidade de acidificar o leite, bem como os coliformes, transformando a lactose em ácido com produção de gás (Oliveira & Caruso, 1983). O impacto dos microrganismos deteriorantes varia consoante os diferentes tipos de leite e produtos láteos, devido a diferentes práticas e fatores como a produção, formulação, embalagem, armazenamento e distribuição. A deterioração resulta, geralmente, de reações enzimáticas microbiológicas (sacarolíticas, proteolíticas e lipolíticas) e ocorre apenas quando se atinge um crescimento microbiano suficiente no produto, que desencadeie a libertação de enzimas. Como a maioria dos microrganismos envolvidos é destruída pela pasteurização, o leite e a deterioração dos produtos láteos são, geralmente, causados pela contaminação pós-pasteurização. No entanto, alguns dos microrganismos deteriorantes são resistentes ao calor (formadores de esporos) e produzem enzimas termoestáveis que transitam para o produto acabado (Ramesh et al., 2015).

Dentro do grupo dos microrganismos nocivos, alguns são patogénicos per si e/ou produzem substâncias tóxicas, podendo causar problemas na saúde humana. Conforme citado no *Diary Processing and Quality Assurance*, os principais agentes causadores de doenças transmitidas pelo leite são *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* (Griffiths, 2000). Outras bactérias associadas a doenças transmitidas pelo leite e produtos láteos incluem *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Cronobacter* spp. A ingestão de leite cru ou o consumo de leite contaminado pode afetar a saúde devido aos agentes patogénicos, resultante, possivelmente, de uma inadequada pasteurização, contaminação pós-pasteurização ou contaminação cruzada de leite pasteurizado com leite cru. O leite contaminado é especialmente perigoso para consumidores de alto risco como por exemplo, grávidas, crianças, idosos e pessoas com sistema imunológico enfraquecido (Ramesh et al., 2015).

Na Tabela 2 encontram-se alguns exemplos de microrganismos nocivos que podem estar presentes no leite. Segundo Gleeson et al. (2013), os principais grupos bacterianos preocupantes para a indústria de laticínios são o grupo *Bacillus cereus*, os clostrídios redutores de sulfito e os termorresistentes psicrófilos.

Tabela 2. Tabela resumo com os principais microrganismos nocivos (deteriorantes e patogénicos) e exemplos associados. Adaptado de Ramesh et al. (2015).

Microrganismos	Grupo	Exemplos
Deteriorantes	Bactérias termorresistentes esporulantes	<i>Bacillus</i> spp. e <i>Clostridium</i> spp.
	Bactérias termorresistentes não esporulantes	<i>Alcaligenes</i> , <i>Microbacterium</i> e <i>Micrococcus</i> Algumas estirpes dos géneros: <i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Mycobacterium</i> e <i>Streptococcus</i>
	Psicrófilos	<i>Acinetobacter</i> , <i>Aerobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Listeria</i> , <i>Pseudomonas</i> e <i>Yersinia</i> .
	Coliformes	<i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> e <i>Citrobacter</i>
	Bactérias do ácido láctico	<i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
Patogénicos	Bactérias	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Brucella melitensis</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Cronobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> —não-verotoxigénica, <i>Escherichia coli</i> – verotoxigénica e O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> e <i>Yersinia enterocolitica</i>
	Agentes virais	Enterovírus, Rotavírus e vírus da Hepatite
	Protozoários parasitas	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Giardia lamblia</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>

2.3 Tratamento térmico do leite

Para dar resposta à eliminação de organismos indesejados, reduzir significativamente a carga bacteriana total, destruir lipases e outras enzimas nativas em produtos láteos e, simultaneamente, garantir a qualidade de produtos alimentares, a segurança para o consumidor e aumento do tempo de vida, surgiu o tratamento térmico (Durazzo, 2018; Hanson et al., 2005). Esta tecnologia de processamento é a mais utilizada na indústria de laticínios e encontra-se dividida em vários tipos, sendo de destacar a termização (processo de exposição de produtos a temperaturas entre 57 e 68 °C durante 5 s a 30 min) e a ultrapasteurização, também designada de *Ultra High Temperature* (UHT) (com temperaturas entre 135-150 °C durante 1-10 s) (Deeth & Smithers, 2018).

Contudo, este tratamento não garante a ausência de microrganismos no produto final. A intensidade do tratamento térmico e a consequente eliminação de microrganismos no leite, está diretamente relacionada com as condições de temperatura/duração escolhidas. A qualidade do leite cru é também apontada como um fator essencial no que concerne à carga microbiana e, consequentemente, à qualidade do produto no final (Durazzo, 2018). Segundo a IDF, o processo UHT garante a eliminação de todas as bactérias que não formam esporos e todos os esporos, exceto microrganismos e esporos altamente resistentes ao calor (Deeth & Smithers, 2018). Os esporos (endósporos) de algumas bactérias termorresistentes, devido à estrutura que lhes é característica, toleram altas temperaturas, podendo sobreviver aos processos de calor aplicados. Além disso, as propriedades hidrofóbicas dos endósporos e sua resistência à dessecação ou desinfecção, permite que adiram ao equipamento de processamento e sobrevivam aos procedimentos de limpeza. Os endósporos constituem, assim, uma grande preocupação no processamento de laticínios, pois podem afetar significativamente a qualidade e a segurança dos alimentos (Lücking et al., 2013). As espécies geralmente encontradas são *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* (Witthuhn et al., 2011). Para além do leite cru, também os ingredientes desidratados, como por exemplo o leite em pó ou o cacau, utilizados na produção de laticínios, contribuem para a carga de esporos nos produtos láteos antes do tratamento térmico (Lima et al., 2011; Rückert et al., 2004; Scott et al., 2007). No entanto, o controlo efetivo dessas bactérias nos produtos láteos e no ambiente de processamento ainda é uma tarefa difícil, devido ao conhecimento limitado sobre as características relacionadas com a origem e a qualidade, como a termorresistência ou a deterioração e potencial tóxico.

De entre vários tratamentos térmicos destaca-se o tratamento UHT que veio revolucionar a preservação de produtos alimentares líquidos através da exposição a um aquecimento breve e intenso. Este tratamento é um processo contínuo que ocorre em sistema fechado, impedindo que o produto seja contaminado por microrganismos transportados pelo ar. O produto passa por estágios de aquecimento e arrefecimento em rápida sucessão. Este choque térmico elimina bactérias patogénicas, assim como outros organismos, que poderiam levar à deterioração do leite, permitindo a sua conservação em segurança durante mais tempo, sem alterar a sua composição ou prejudicar as suas qualidades nutricionais (Mimosa, 2019).

Para além da combinação do calor e tempo de aquecimento influenciarem diretamente a destruição de microrganismos, as alterações das características organoléticas e químicas do produto final também são passíveis de acontecer. Verifica-se que um maior tempo de exposição a alta temperatura traduz-se no escurecimento do leite, garantindo-lhe um sabor caramelizado. Na Figura 4 encontram-se resumidas as possíveis combinações temperatura/tempo que alteram as propriedades do leite, quer a nível microbiológico, quer a nível químico (Bylund, 1995).

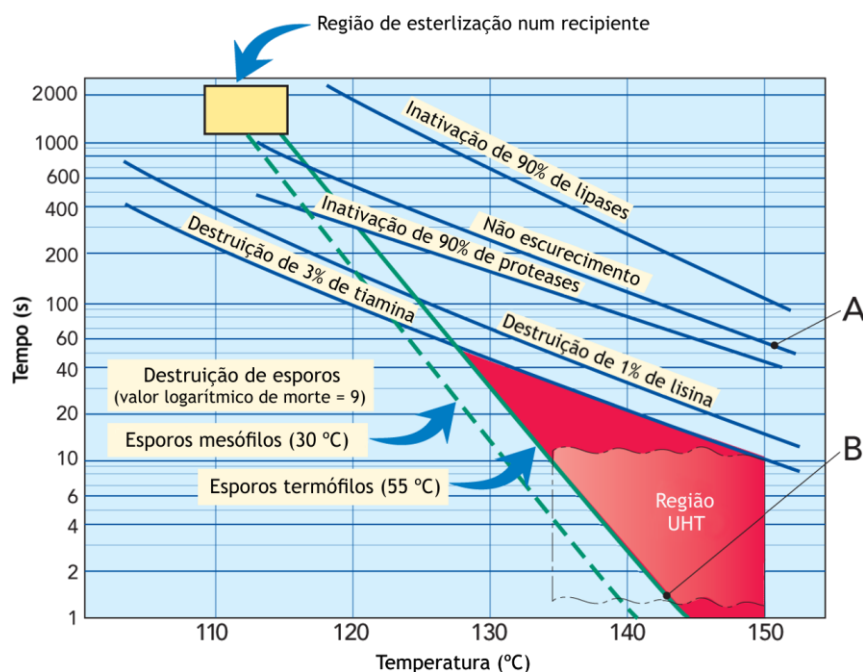


Figura 4. Relação entre os efeitos de esterilização e o escurecimento. A linha A representa o limite inferior de combinações de tempo/temperatura que faz com que o leite fique escurecido. A linha B é o limite inferior de combinações para esterilização completa (destruição de esporos termófilos). Adaptado de Bylund (1995).

A Figura 4 compara o método de esterilização com o UHT, e verifica-se que ambos apresentam igual efeito esterilizante. No entanto, há uma diferença notória nos efeitos químicos: a reação de escurecimento e destruição de vitaminas e aminoácidos para gamas de temperatura elevada. Esta é a razão pela qual o leite UHT tem melhor sabor e mais alto valor nutritivo do que o leite esterilizado (Bylund, 1995).

2.4 Processo de produção na Lactogal

A produção de leite é um processo constituído por diversas etapas. Deste modo, a Lactogal desenvolveu um processo com o propósito de garantir a qualidade do leite ao consumidor final, eliminando assim grande parte da microbiota (também designada por flora, denominação usada neste documento) encontrada no leite cru. Para além do processo de produção, é importante garantir ótimas condições de ordenha (não a realizando em vacas com mastites e/ou com outras complicações sujeitas a toma de medicação), devendo ser o mais higiénicas possível e o sistema de ordenha deverá ser projetado para evitar o arejamento, de forma a minimizar a contaminação do leite com o ar circundante durante a ordenha (Bylund, 1995). Após ordenha o leite deve ser imediatamente arrefecido de 0 a 4 °C (Mimosa, 2019). Ao longo de todo o processo de produção a temperatura é um fator que afeta fortemente a qualidade do produto, sendo então de extrema importância que este seja mantido a baixas temperaturas durante todo o processo. A quebra da cadeia de arrefecimento poderá levar ao desenvolvimento de microrganismos no leite, originando produtos metabólicos e enzimas, que se acumulam no leite e que alteram as suas propriedades organoléticas (Bylund, 1995).

Na Figura 5 encontra-se esquematizado o processo de produção de leite na Lactogal.

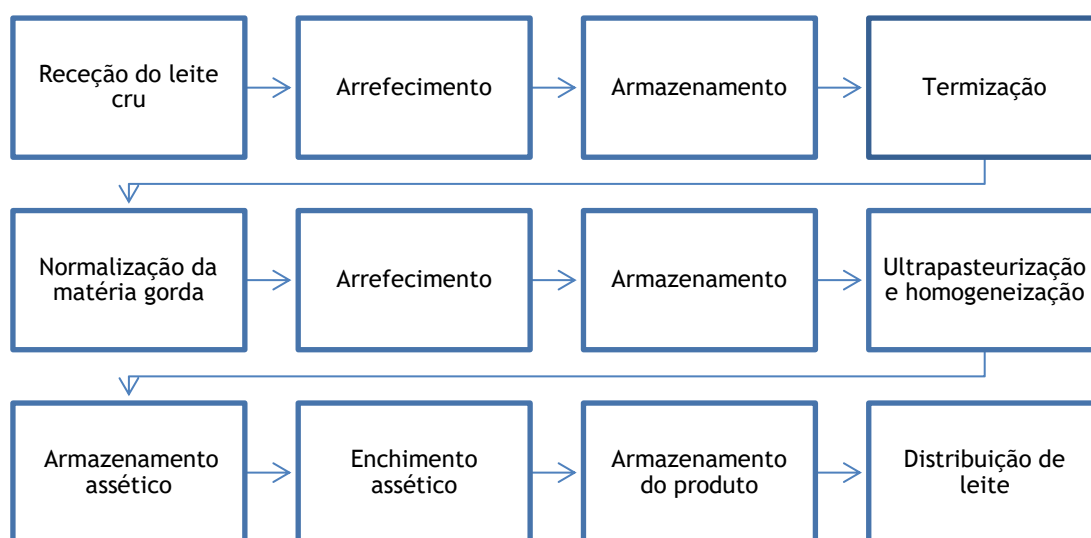


Figura 5. Esquematização do processo de produção de leite na Lactogal, desde a sua receção na fábrica até à distribuição para o mercado.

A primeira etapa é referente à receção de leite cru na fábrica. O transporte de leite efetua-se através de camiões cisterna isotérmicos, de modo a que o leite seja mantido a baixas temperaturas e sem entrada de ar.

Quando chega à Lactogal é colhida uma amostra manual, que é submetida a análises para avaliar a sua qualidade, nomeadamente: sabor e cheiro, temperatura, teste à presença de inibidores (antibióticos), pH (deverá ser entre 6,6 e 6,8), prova de álcool a 80% (não deve ocorrer coagulação do leite) e acidez (entre 16 mL e 18 mL com NaOH 1,0 N). Estas análises são determinantes para avaliar se o leite pode ser rececionado ou não. Caso teste positivo a inibidores ou outras anomalias nos exames organoléticos ou na prova de álcool, o leite é rejeitado e não é descarregado.

Para além das análises supracitadas, a todos os camiões é ainda recolhida uma amostra automática (coletor automático em linha), na receção, para avaliação de outros parâmetros como a enumeração de células somáticas e de bactérias, teor de proteína, teor de matéria gorda e ponto de congelação. Estas análises são realizadas no laboratório da Associação Interprofissional do Leite e Lacticínios (Alip). O resultado destes testes fica disponível informaticamente no dia posterior às análises, na base de dados da Lactogal.

É de salientar que o resultado destes testes terá uma relação direta com a compensação para o agricultor. O valor pago por litro de leite, depende dos resultados desta amostra automática, em todos os parâmetros indicados.

Após as análises da amostra manual serem realizadas em autocontrolo, na receção, e dada a conformidade ao leite, este é descarregado e é determinada a quantidade a rececionar por caudalímetros volumétricos em linha, ao que se segue a limpeza dos camiões.

Após ser descarregado, o leite é arrefecido entre 2 e 6 °C num permutador de calor de placas e posteriormente armazenado num tanque vertical incorporado com agitadores para impedir a separação da nata por gravidade. A agitação é suave de forma a evitar o arejamento do leite e a desintegração dos glóbulos de gordura, impedindo assim a sua exposição ao ataque das enzimas lipase nele presentes (Bylund, 1995).

A etapa que se segue é um primeiro tratamento térmico (termização) com o objetivo de eliminar a maioria dos microrganismos presentes no leite e, eventualmente, organismos potencialmente patogénicos. Simultaneamente ao processo térmico ocorre a normalização da matéria gorda. Desta forma, o leite é aquecido a 64 °C durante 15 s e desnata na centrífuga a uma velocidade de 4500 rotações por minuto (rpm). Findo este processo, o leite é arrefecido a uma temperatura inferior a 6 °C e armazenado no tanque de leite termizado (leite já normalizado). De seguida, recolhem-se novamente amostras para realizar análises físico-químicas (pH e características organoléticas) e microbiológicas (contagem da flora aeróbia mesófila e termófila, e esporos termorresistentes).

É de referir que a separação da matéria gorda do leite é conseguida através da agitação provocada no interior da centrífuga. A nata do leite é constituída por pequenos glóbulos dispersos no soro do leite, e encontra-se estabilizada por uma membrana muito fina (5 a 10 nm de espessura). Assim, a uma velocidade de 4500 rpm ocorre a separação de fases baseada na diferença de densidade, originando duas correntes distintas. As partículas com maior densidade movem-se para a periferia do equipamento e ficam acondicionadas no espaço, enquanto que as partículas com menor densidade (glóbulos de gordura) se movem para a parte central do equipamento, em direção ao eixo de rotação, sendo obrigadas a sair pela parte superior do equipamento (Bylund, 1995). No fim do processo, faz-se um ajuste do teor de matéria gorda, sendo adicionada gordura no teor pretendido, consoante o tipo de leite desejado. O leite gordo apresenta um teor de matéria gorda mínimo de 3,50% (m/m), o leite meio gordo entre 1,50% (m/m) e 1,80% (m/m) e o leite magro um teor de matéria gorda máximo de 0,50% (m/m) (Mimosa, 2019).

Os processos de separação e normalização da matéria gorda geralmente provocam o aumento da temperatura do leite, pelo que se segue uma etapa de arrefecimento previamente ao seu armazenamento.

De seguida, o leite é submetido ao tratamento UHT. A partir desta etapa, todo o processo a jusante ocorre sob condições de assepsia. Na Lactogal, o aquecimento ocorre a uma temperatura de 141 °C durante 6 s, para leite branco. O arrefecimento ocorre em permutadores de placas, que o levam até uma temperatura de cerca de 20 °C.

O processo de tratamento UHT elimina todas as bactérias designadas “viáveis”, ou seja, todas as bactérias passíveis de desenvolvimento, possibilitando a estabilidade do leite ao longo do tempo de vida. A destruição das bactérias no processo de UHT não é completa, mas é suficiente para provocar a diminuição satisfatória de esporos e restante flora. Algumas bactérias termorresistentes esporuladas permanecem no leite ultrapasteurizado, mas não são capazes de se desenvolver à temperatura de armazenamento.

Logo após o processo UHT, o leite é homogeneizado por um homogeneizador assético incorporado no final do equipamento UHT, com o objetivo de evitar a formação de nata, destruindo finamente os glóbulos de gordura ou até mesmo desintegrando-os (Bylund, 1995).

O leite ultrapasteurizado é armazenado provisoriamente num tanque assético, denominado de tanque pulmão, com capacidade de 20000 L, sempre que existam diferenças de balanço entre a quantidade de leite que está a ser tratada e a que está a ser embalada. O leite é embalado em condições asséticas, por máquinas da Tetra Pak. As embalagens produzidas por esta empresa são constituídas por várias camadas. O principal componente é o papel-cartão, feito de material renovável que confere estabilidade, resistência e suavidade à superfície para realizar a impressão (Tetra Pak International S.A., n.d.). Este é revestido interna e externamente por uma fina camada de polietileno, que protege contra a humidade e permite que o papel-cartão adira à camada interna que é a folha de alumínio. Esta protege o produto da luz e do oxigénio mantendo, assim, o valor nutricional e as características organoléticas do produto. Internamente à folha de alumínio existem mais duas camadas de polietileno. Estas embalagens foram desenhadas com o objetivo de facilitar a distribuição do alimento, manter a sua higiene, proteger os nutrientes e sabor, reduzir a deterioração e o desperdício e transmitir informações do produto (Figura 6). Posteriormente, as embalagens de leite são dispostas em paletes e são armazenadas até saírem os resultados das análises físico-químicas, microbiológicas e organoléticas. Por fim, as embalagens de leite branco são distribuídas para o mercado.

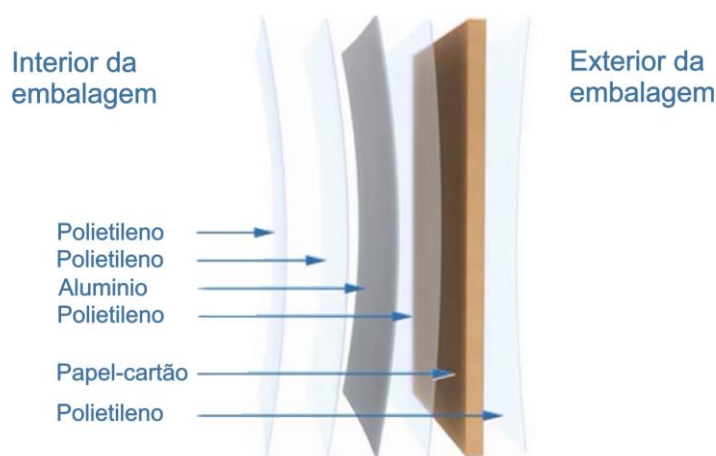


Figura 6. Constituição das embalagens da Tetra Pak. Adaptado de Tetra Pak International S.A. (n.d.).

2.4.1 Produção de leite achocolatado com leite recuperado

O tema do presente trabalho centra-se na produção de leite com chocolate da marca Lactogal (Mimosa e Agros). Neste tipo de leite é incorporado leite recuperado como forma de reaproveitamento de leite branco que sofreu tratamento UHT, que de outra forma seria desperdiçado no fim do processo (após enchimento). O leite branco reaproveitado pode ser leite embalado ((a) e (b)) e leite não embalado (leite que fica retido nas linhas no final de produção). Relativamente ao leite embalado este pode ser (a) recolhido na zona da produção (rotineiramente são analisadas as embalagens e, para isso, é necessário que o leite, no interior do pacote, seja transferido para um tanque de recolha móvel) e (b) analisado no laboratório de microbiologia (os pacotes recolhidos são analisados e, estando o leite conforme, ou seja, com contagens bacterianas inferiores a 150 células viáveis/mL ao fim de 3 dias de incubação a 30 °C e pH entre 6,50 e 6,74 ao fim de 5 dias de incubação a 30 °C, é transferido para um tanque).

Este leite reaproveitado é apenas utilizado para produzir leite composto, ou seja, leite com chocolate. Isto deve-se às modificações que lhe são conferidas, como o escurecimento e o sabor caramelizado, causadas pelo duplo tratamento UHT. No entanto, não são sentidas no processo de produção de leite com chocolate, pelo que o leite recuperado é nele incorporado. O leite recuperado não é utilizado para produzir leites com chocolate escolares.

À medida que o tanque de recolha fica cheio, o leite vai sendo transferido para os tanques de leite recuperado (TQ84 e TQ85). Quando um deles fica cheio o leite é encaminhado para o Almix 1, onde é feita a mistura do leite recuperado com leite em pó, de forma a fazer a correção do extrato seco. Este leite em pó é previamente termizado a uma temperatura de 65 °C e 85 °C, perfazendo um total de exposição de 35 min. Após o acerto com leite em pó, o leite recuperado sofre um tratamento térmico (64 °C - 15 s), sendo posteriormente misturado com leite branco, nos tanques TQ10, TQ11, TQ12 ou TQ13.

O leite branco termizado foi previamente normalizado em matéria gorda. O teor de matéria gorda pretendido é entre 1,50% (m/m) e 1,80% (m/m). O tanque de armazenamento de leite termizado (TQ10-13), que contém a mistura de leite recuperado com leite branco, contém um volume total de 200000 L. Do volume total, a percentagem correspondente de leite branco é superior à de leite recuperado sendo, no máximo, permitida a adição de 40% de leite recuperado.

Os ingredientes (cacau, açúcar, sal e aromas) sofrem um processo de termização (65 °C, e posteriormente 85 °C, perfazendo um tempo total de exposição de 35 min) previamente à sua mistura com o leite final (branco e recuperado) termizado, no Almix 2. No processo de termização, a calda é aquecida num permutador à temperatura mais baixa, sendo de seguida,

encaminhada para um tanque. Este processo repete-se para a temperatura mais elevada, sendo por fim armazenado nos tanques TQ 47-50. É importante referir que apenas é transferido um volume médio de 24000 L de leite final dos tanques TQ 10-13 para o Almix 2, sendo feita uma produção segmentada, isto é, por lotes. Assim, um volume de 24000 L de leite final termizado, é encaminhado para o Almix 2, onde é homogeneizado com os ingredientes mencionados. Por fim, o leite é encaminhado para o tratamento UHT (151 °C, 6 s). À medida que o leite é libertado do tratamento UHT, é transferido para a linha de enchimento onde é feito o embalamento do leite com chocolate. Caso as máquinas de enchimento estejam ocupadas pode ser armazenado temporariamente no tanque pulmão assético. Na Figura 7 é possível observar a esquematização do processo descrito.

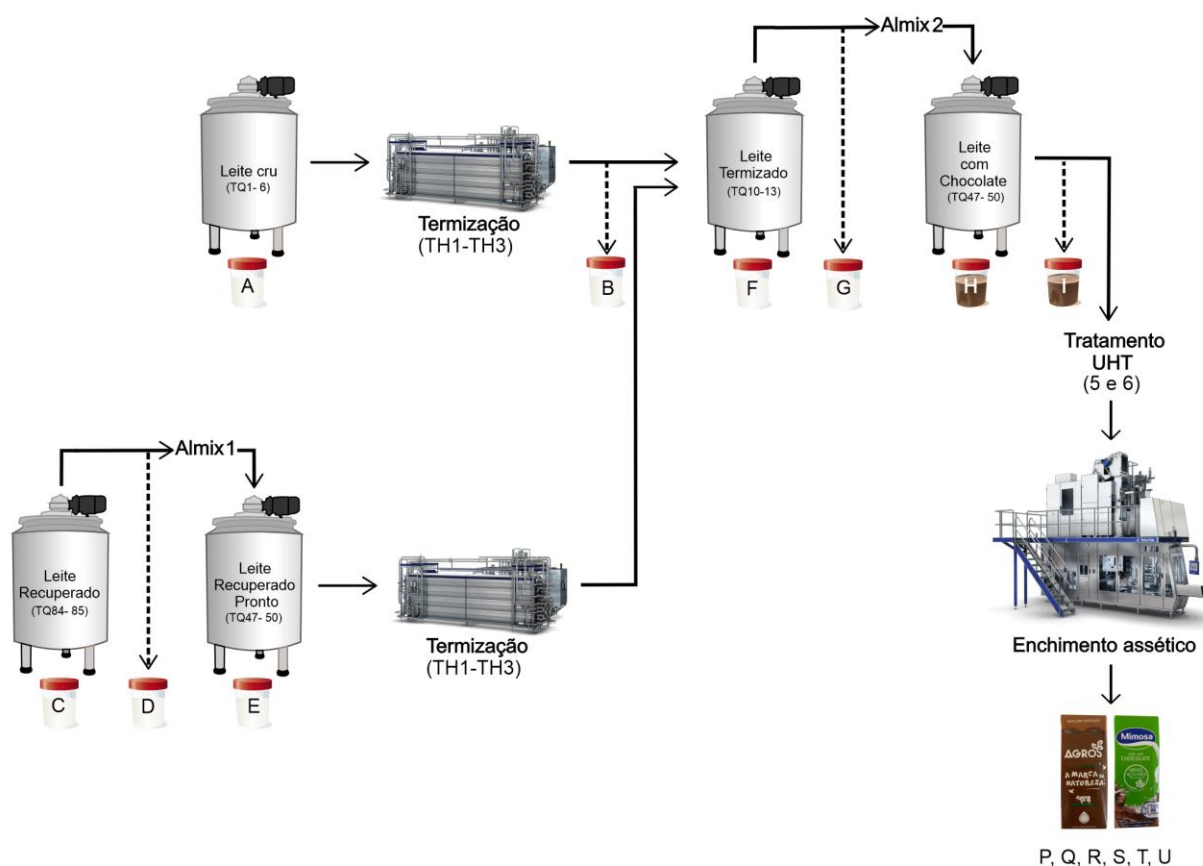


Figura 7. Esquematização do processo de produção e respetivo local de recolha de amostras de leite UHT. O processo encontra-se descrito na seção introdução. As letras de A a I referem-se aos locais de colheita de amostras (ver secção 3.2.1).

3 Materiais e Métodos

Este estudo foi desenvolvido na unidade fabril de Modivas (Vila do Conde), que produz cerca de 1,5 milhões de litros de leite UHT por dia, dos quais 75 mil litros, em média, correspondem a leite com chocolate.

3.1 Materiais

No presente capítulo, encontram-se descritos os meios de cultura, bem como os métodos utilizados para a realização do presente trabalho. Na Tabela 3 apresentam-se os meios de cultura utilizados, assim como a respetiva composição, flora microbiológica e marca associada.

Tabela 3. Meios de cultura utilizados ao longo do trabalho desenvolvido.

Meio de cultura/ Solução	Composição (g/L)	Grupo microbiano	Marca
<i>Milk Plate Count Agar</i> (MPCA)	Tryptona 5,0; extrato de levedura 2,5; glicose 1,0; pó de leite magro 1,0; agar 10,0	Aeróbios mesófilos e termófilos	Liofilchem S.r.l.
<i>Reinforced Clostridial Agar</i> (RCA)	Caseína peptona 10,0; extrato de levedura 3,0; extrato de carne 20,0; dextrose 5,0; NaCl 5,0; acetato de sódio 3,0; solução de amido 1,0; cisteína 0,5; agar 15,0	Anaeróbios	Sharlau
Solução de Ringer	NaCl 2,25; KCl 0,105; CaCl ₂ 0,06; NaHCO ₃ 0,05	-	LabM

Para além dos meios de cultura, foram ainda utilizados outros tipos de materiais que se encontram descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Materiais utilizados ao longo da atividade experimental.

Material/ Equipamento	Marca
Pipetas graduadas	VWR International, LLC
Placas de Petri	VWR International, LLC
Tubos de ensaio	VWR International, LLC
Frascos esterilizados 100 mL	FL medical 100 ml
Câmara de fluxo laminar	Steril-Helios Labor
D- Count®	Biomérieux
Incubadora de 30 °C	Memmert
Incubadora de 55 °C	Memmert
Banho de água	Memmert
Vórtex	Techno Kartell
Potenciómetro	HANNA Instruments

3.2 Métodos

Este capítulo encontra-se dividido em quatro subcapítulos, nos quais são descritos os procedimentos e metodologias utilizados para a realização deste trabalho.

É de extrema importância referir que foram avaliadas amostras de leite colhidas em diversos pontos do processo de produção e ainda o produto final, isto é, o conteúdo das embalagens de leite com chocolate UHT. Estes dois processos de análise obrigam à necessidade de elaboração de procedimentos de colheita distintos. No Anexo I encontram-se algumas considerações importantes para a realização dos procedimentos.

3.2.1 Local e método de colheita das amostras de leite

De forma a fazer uma análise microbiológica ao percurso de produção de leite com chocolate desde o tanque de leite cru até ao produto final, recolheram-se nove amostras por cada produção de leite com chocolate e foi registada a respetiva hora de colheita. Na Figura 7 encontra-se esquematizado o processo sequencial da colheita das amostras e pacotes seguintes:

- A. **Leite cru** (à entrada do termizador),
 - B. **Leite cru termizado** (à saída do termizador),
 - C. **Leite recuperado** (aquando do enchimento do tanque de leite recuperado)
 - D. **Leite recuperado** (aquando da passagem do leite recuperado para o tanque de mistura Almix 1, onde ocorre a mistura do leite recuperado com leite em pó)
 - E. **Leite recuperado** (quando o leite recuperado (D) está pronto para ser misturado com o leite cru termizado),
 - F. **Leite termizado** (aquando do enchimento do tanque que contém: uma mistura de leite cru termizado e de leite recuperado com leite em pó termizado)
 - G. **Leite termizado** (aquando da passagem da mistura de leite cru termizado e de leite recuperado com leite em pó termizado para o Almix 2, que corresponde ao tanque onde é feita a mistura com o cacau e outras substâncias),
 - H. **Leite com chocolate** (leite com chocolate pronto perfeitamente homogeneizado)
 - I. **Leite com chocolate** (aquando da passagem de leite para o processo de UHT, seguido do embalamento) e por último,
- P/Q/R/S/T/U. **Produto final** (pacote de leite retirado da linha de embalamento, dependendo da produção).

Os trabalhadores encarregados da produção de leite com chocolate foram sensibilizados para a recolha das amostras. Estes foram colhidas semanalmente, de domingo a quinta-feira, cumprindo rigorosamente o seguinte procedimento: (1) desinfetar a torneira do tanque com álcool a 70%, (2) abrir a torneira e permitir que verta um volume reduzido de

leite, (3) recolher o leite para um frasco esterilizado de 100 mL e, por último, (4) fechar a torneira e desinfetá-la novamente com álcool. Este procedimento permite impedir a contaminação da amostra colhida com possíveis microrganismos que estejam alojados na torneira do tanque, impossibilitando também o enviesamento das colheitas seguintes.

É importante referir a diferença entre lote e produção. A produção de leite com chocolate compreende um conjunto de lotes, variável em número, dependendo da necessidade de produção. Por sua vez, cada lote é constituído por um volume de leite fixo, em média de 24 mil litros.

Para gerar diversos lotes, numa mesma produção, é utilizada a mesma mistura de leite cru termizado e de leite recuperado com leite em pó termizado (tanques TQ10-13; amostra F), que é concebido no início da produção, com o objetivo de vir a ser misturado com o cacau e outros ingredientes. No entanto, a produção dos diversos lotes não ocorre em simultâneo. Assim, e tendo em conta que o período de armazenamento da mistura de leite acima referida é variável de lote para lote, torna-se essencial a recolha de uma amostra aquando da produção de cada lote. Idealmente, a composição microbiológica manter-se-ia estável ao longo do tempo, no entanto, não existe certeza quanto a esta questão, pelo que foi alvo de análise. Em suma, a justificação da recolha da amostra G prende-se com a necessidade de compreender a influência temporal na evolução microbiológica no leite nos tanques TQ10- 13 (de acordo com a Figura 7).

Tal como acima referido, o número de lotes produzidos é variável. Assim, o número de amostras recolhidas é dependente do número de lotes produzidos, ou seja, por cada lote produzido é recolhida uma amostra G, H e I (amostras supracitadas).

Para terminar, em nota informativa, importa referir que foram analisadas ao longo deste trabalho seis produções, numeradas de 1 a 6. Os lotes seguiram o mesmo princípio de numeração (G1-6; H1-6; I1-6). Quanto aos pacotes, foram numerados relativamente à sequência de produção, isto é, P, Q, R, S, T e U, são os pacotes relativos às produções de 1 a 6. Seguida da letra, foi colocado o número de 1 a 6, correspondente ao número de lote (P1-6; Q1-6; S1-6; T1-6; U1-6). Apesar de terem sido colhidas diversas amostras, apenas parte delas foi selecionada para posterior análise.

3.2.2 Caracterização microbiológica do leite nas várias etapas do processo de produção de leite com chocolate e análise do produto final

Tal como explicitado na parte inicial deste capítulo, tanto as recolhas das amostras de leite como as do produto final, foram analisadas seguindo procedimentos distintos, isto é, as amostras de leite foram avaliadas quanto à carga microbiana e temperatura de produção,

enquanto o produto final foi avaliado somente quanto à carga microbiana, sendo esta avaliada por dois métodos distintos (tradicional e automático), e pH.

Para avaliar a carga microbiana em cada amostra de leite colhida durante a produção (A-I), enumeram-se os organismos cultiváveis de diferentes grupos microbianos: flora aeróbia mesófila (FAM); flora aeróbia termófila (FAT); flora aeróbia termorresistente mesófila (EATM) e flora aeróbia termorresistente termófila (EATT). Para tal, recorreu-se ao método de incorporação em agar. Para avaliar a carga microbiana do produto final (P a U) enumeraram-se as células totais viáveis (análise automática por D-Count®), sendo confirmadas por enumeração de cultiváveis (provas de estufa).

3.2.2.1 Flora aeróbia mesófila e flora aeróbia termófila

Para a enumeração de FAM e FAT, as amostras (A a I) foram diluídas sucessivamente. Para tal, retirou-se 1 mL da amostra com auxílio de uma pipeta graduada e adicionou-se a um tubo de ensaio com 9 mL de solução de Ringer estéril. De seguida, procedeu-se às diluições sucessivas necessárias, dependendo do tipo de amostra a analisar (Figura I. 1, no Anexo I). Entre diluições e, em cada inoculação, homogeneizou-se a suspensão. De cada diluição, transferiu-se 1 mL de amostra para uma placa de Petri estéril, à qual se adicionou cerca de 10 mL de meio MPCA a cerca de 45 °C. Este procedimento foi realizado em duplicado. Após homogeneização e solidificação do meio com a amostra, as placas foram invertidas e incubadas durante 3 dias a 30 ± 1 °C (FAM) ou a 55 ± 1 °C (FAT). Todo o procedimento foi realizado na câmara de fluxo laminar cuja esterilidade foi avaliada em cada produção. Findo o período de incubação, efetuou-se a contagem de UFC. Usou-se como controlo negativo uma placa apenas com meio MPCA. Na Figura 8 e Figura 9 é possível observar esquemas exemplificativos do procedimento descrito.

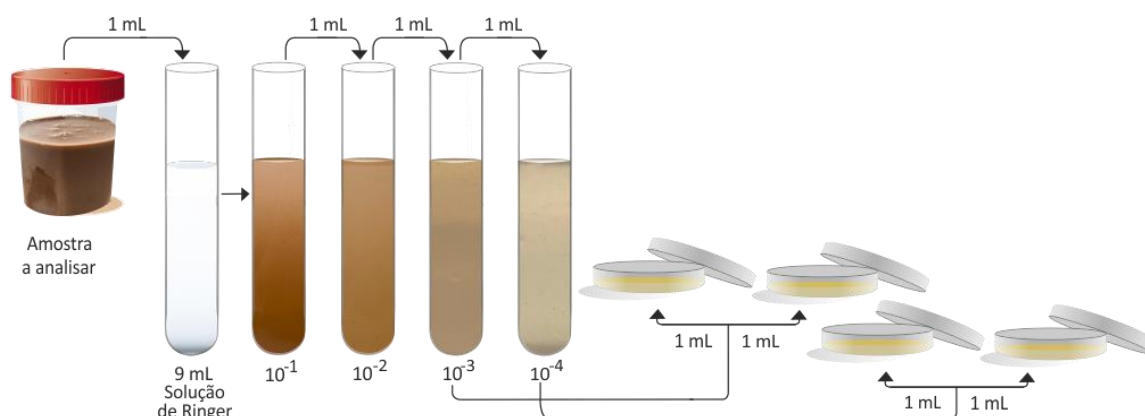


Figura 8. Esquematização exemplificativa do método de referência utilizado para a análise da flora aeróbia mesófila à amostra I. As amostras encontram-se enumeradas no subcapítulo 3.2.1. As placas foram incubadas a 30 ± 1 °C durante 3 dias.

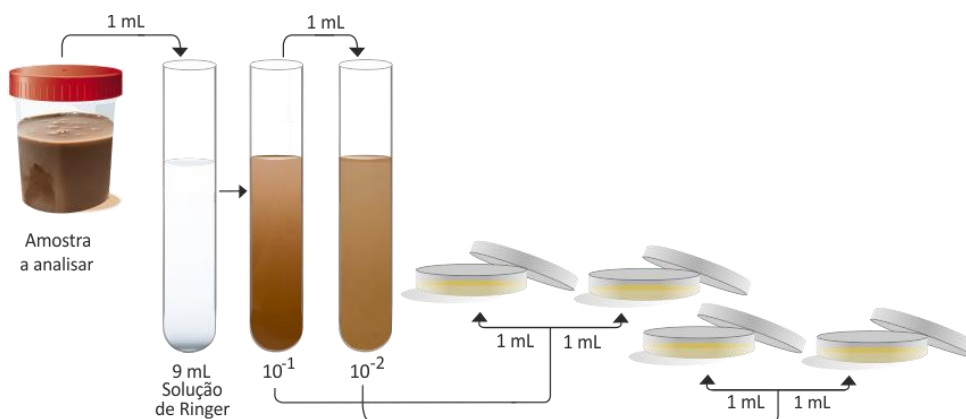


Figura 9. Esquematização exemplificativa do método de referência utilizado para a análise da flora aeróbia termófila à amostra I. As amostras encontram-se enumeradas no subcapítulo 3.2.1. As placas foram incubadas a 55 ± 1 °C durante 3 dias.

3.2.2.2 Flora aeróbia termorresistente mesófila e termófila

Para a quantificação da flora aeróbia termorresistente, mediram-se $10 \pm 0,3$ mL de amostra para um tubo de ensaio e colocaram-se em banho-maria a 100 °C durante 30 minutos. Repetiu-se o procedimento para as diversas amostras, com exceção da amostra A (descrita na secção 3.2.1). A justificação para a escolha do tempo/temperatura prende-se com o facto, de o leite recuperado ser um leite previamente tratado, assim, para determinar microrganismos termorresistentes (esporulados) seria necessário respeitar o tempo/temperatura escolhidos. Findos os 30 minutos, os tubos foram retirados do banho, e após arrefecimento, com auxílio de uma pipeta graduada transferiu-se 1 mL para uma placa de Petri estéril, em duplicado. De seguida, adicionou-se meio MPCA, no sentido de incorporar o meio com a amostra. Todo o procedimento foi realizado na câmara de fluxo laminar. Após homogeneização e solidificação dos meios, as placas foram incubadas durante 3 dias a 30 ± 1 °C (termorresistentes mesófilos) e 55 ± 1 °C (termorresistentes termófilos). Findo o período de incubação, procedeu-se à contagem das UFC. Foi usada como controlo negativo uma placa que continha apenas MPCA. Na Figura 10 é possível observar a esquematização do procedimento descrito.

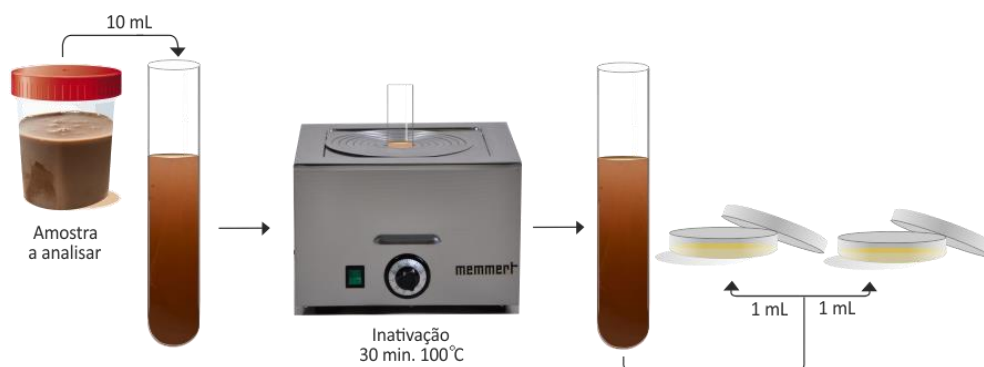


Figura 10. Esquematização exemplificativa do método utilizado para a análise da flora aeróbia termorresistente à amostra I. As amostras encontram-se enumeradas no subcapítulo 3.2.1. As placas foram incubadas durante 3 dias a 30 ± 1 °C (EATM) e 55 ± 1 °C (EATT).

3.2.2.3 Caracterização microbiológica do produto final

Para realizar esta análise, foram retirados pacotes de leite achocolatado (produto final) da linha de produção correspondentes às produções e aos respetivos lotes em estudo, tendo sido recolhidos 4 pacotes por cada lote. De seguida, e de cada lote, foram incubados três pacotes (7 dias a 55 ± 1 °C, 3 dias a 30 ± 1 °C e 15 dias a 30 ± 1 °C) e o quarto não foi incubado. Os pacotes incubados a 7 e 15 dias, bem como os pacotes não incubados foram analisados segundo o método tradicional (provas de estufas). Além disso, os pacotes incubados a 3 e 7 dias foram analisados recorrendo ao método automático (D-Count®).

3.2.2.3.1 Enumeração das células viáveis totais - Método automático (D- Count®)

O D-Count® é um sistema de citometria de fluxo desenhado para análises microbiológicas de amostras em suspensão. Tem por base uma tecnologia por marcação de um substrato de viabilidade através da clivagem enzimática do mesmo no citoplasma das células viáveis dos microrganismos. O fluorocromo resultante emite fluorescência quando as células marcadas são atingidas por um feixe laser de 488 nm (bioMérieux, 2017). Para que tal aconteça, têm de ser cumpridos dois critérios de viabilidade: atividade da enzima e integridade da membrana. Desta forma, o principal objetivo é contar o número de células totais viáveis presentes numa amostra.

O protocolo utilizado para realizar as análises aos pacotes de leite foi o implementado na fábrica. Para a realização das contagens, foram utilizados os seguintes reagentes: Chem Sol B26/1 (a), ChemSol S 50X (b), Chem Chrome V26 (c), Diluente II, CSR, Isored, CS26B, CS26A, Cleaning 5 (f) e Cleaning 3 (j). Para utilização do equipamento, foi necessário realizar a lavagem (com (b)) e calibração do equipamento (reagente padrão: Standard G). Simultaneamente, ocorreu a estabilização do raio laser.

A segunda etapa iniciou-se com a preparação das amostras a analisar (g), colocando-se 0,3 mL de cada pacote em cada tubo do equipamento. Para garantir a correta medição e validação das amostras em estudo, utilizou-se um controlo positivo (tubo com 0,2 mL leite termizado branco) e um controlo negativo (tubo vazio).

Para a realização da terceira etapa foi necessário proceder à preparação dos reagentes. Alguns reagentes/soluções obrigaram a preparação no laboratório, nomeadamente: (d) mistura do reagente CSR com o Diluent II, e adição de 15 gotas de Isored seguida de homogeneização, (e) mistura e homogeneização de CS26B com CS26A e (h) mistura de 40 mL ChemSol S 50X com suplemento. De seguida, adicionaram-se 15 gotas de um agente estabilizante (Antifoam) no frasco de esgoto (i). Os dois pipetadores foram mergulhados em duas soluções distintas, (a) e (f), que têm o objetivo de lavar e descontaminar os pipetadores

entre análises de várias amostras, evitando, assim, contaminações. Por último, colocaram-se os reagentes/soluções e amostras no equipamento nas devidas posições (Figura 11).

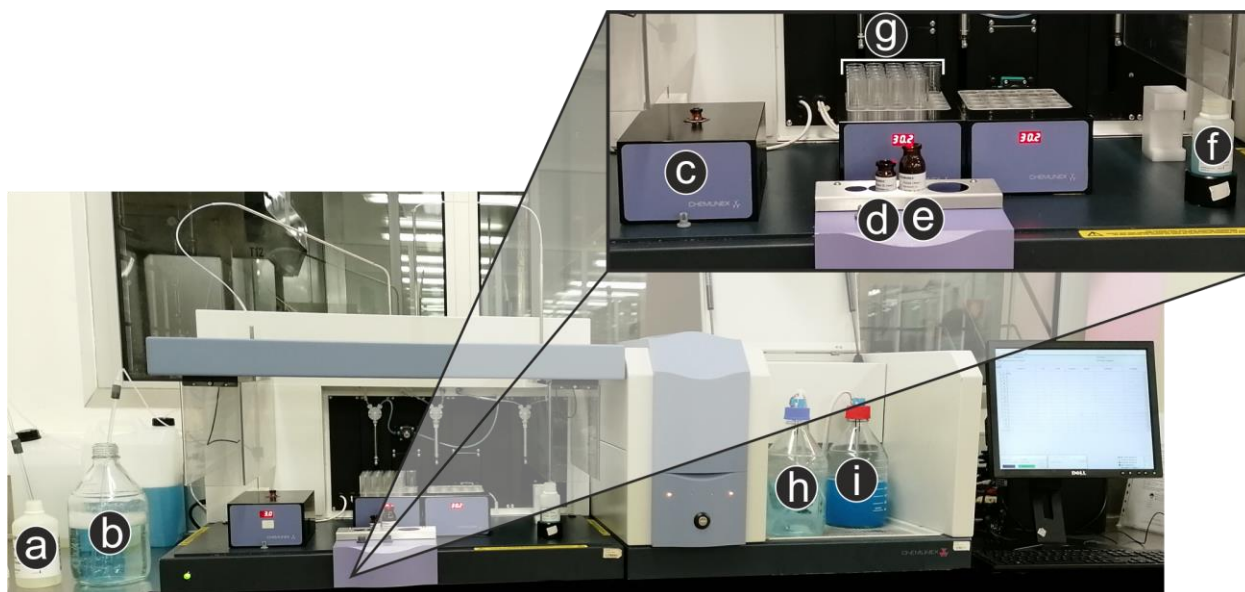


Figura 11. Equipamento D-count® com a respetiva ampliação da zona da análise e identificação dos reagentes/soluções e amostras a analisar. A legenda atribuída a cada letra encontra-se ao longo do texto.

A aplicação utilizada para analisar as amostras foi “A0720-03”. Conforme eram analisadas, os resultados das contagens iam surgindo no monitor acoplado ao D-Count®. Após realização das análises diárias, foi necessário realizar a lavagem interna do equipamento, com o objetivo de eliminar possíveis resíduos que possam ter restado de análises anteriores. Assim, foi feita uma calibração com (f), seguida de uma lavagem com (j). Por último, foram removidos os resíduos restantes, com (b).

3.2.2.3.2 Detecção e enumeração de células cultiváveis (provas de estufa)

Em cada pacote analisado, foi realizado o método de estriamento e incorporação de agar. O método de estriamento está esquematizado na Figura I. 2, no Anexo I.

Para efetuar o segundo método, incorporou-se 1 mL e 0,1 mL de leite com chocolate UHT, com auxílio de uma pipeta graduada, em placas de Petri utilizando-se o meio MPCA. Após homogeneização e solidificação do meio com a amostra, incubaram-se as placas a 55 ± 1 °C (FAT) e a 30 ± 1 °C (FAM) durante 3 dias. Findo o período de incubação, verificou-se se as estrias se encontravam positivas ou negativas e realizaram-se as contagens das colónias que cresceram no meio de cultura. Por último, realizaram-se provas para detetar a presença de microrganismos anaeróbios. Para tal, colocou-se 1 mL e 0,1 mL, com auxílio de uma pipeta graduada, de cada amostra de leite com chocolate UHT em tubos de ensaio de tampa roscada. De seguida, foi adicionado o meio RCA para incorporar as amostras. Os tubos de ensaio foram incubados a 30 ± 1 °C durante 3 dias. De forma a controlar a esterilidade do meio, colocou-se uma placa com meio MPCA e um tubo de ensaio com tampa roscada com meio RCA (controles

negativos). Este procedimento difere do utilizado para as amostras de A a I, uma vez que a carga microbiana é bastante inferior, devido ao processo UHT sofrido, pelo que não é necessário diluir sucessivamente. Uma vez que se trata do produto final, deverá ser analisado com mais detalhe, de forma a detetar a presença de microrganismos aeróbios. A razão desta pesquisa prende-se com a capacidade destes microrganismos se desenvolverem no interior do pacote. Na Figura 12 encontra-se descrito o procedimento relativo ao produto final.

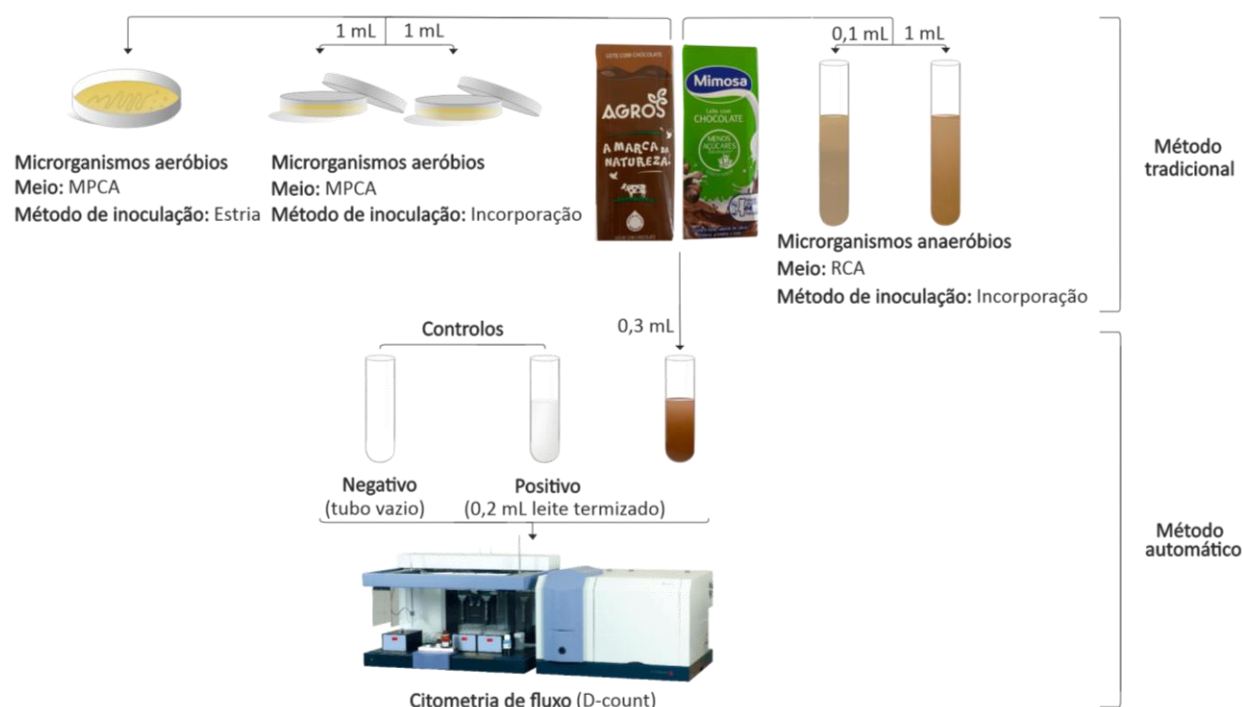


Figura 12. Esquematização das análises realizadas ao produto final, incluindo os dois métodos utilizados - tradicional e automático. Todo o procedimento foi realizado na câmara de fluxo, cuja esterilidade foi avaliada.

3.2.2.3.3 Determinação do pH

Adicionalmente às análises microbiológicas, foi ainda medido o pH do leite dos pacotes a uma temperatura de 20 °C, utilizando um potenciómetro calibrado, tendo sido realizada a medição diretamente no pacote.

3.2.2.4 Resumo das análises realizadas às amostras e produto final

Na Tabela 5 encontra-se um quadro resumo das diversas diluições utilizadas e das condições de incubação utilizadas para as diversas amostras, desde o leite cru (A) ao leite com chocolate (I). Na Tabela 6 estão sintetizadas as análises realizadas ao produto final (pacote).

Tabela 5. Diluições utilizadas para as amostras de leite consoante a caracterização microbiológica em estudo.

	FAM	EATM	FAT	EATT
Incubação	$30 \pm 1 ^\circ\text{C}$	$30 \pm 1 ^\circ\text{C}$	$55 \pm 1 ^\circ\text{C}$	$55 \pm 1 ^\circ\text{C}$
Amostras	3 dias	3 dias	3 dias	3 dias
A	$10^{-3}/10^{-4}$	ND	ND	ND
B	$10^{-3}/10^{-4}$	10^0	$10^{-2}/10^{-3}$	10^0
C/D/E	$10^{-4}/10^{-5}/10^{-6}$	10^0	$10^{-1}/10^{-2}$	10^0
F/G	$10^{-3}/10^{-4}$	10^0	$10^{-2}/10^{-3}$	10^0
H/I	$10^{-3}/10^{-4}$	10^0	$10^{-1}/10^{-2}$	10^0

ND - Não determinado

Tabela 6. Métodos de referência utilizados para o produto (diluição e incorporação em agar e método de estriamento). O tempo de incubação das placas e dos tubos de ensaio é 3 dias e a temperatura é determinada pela temperatura a que o pacote foi incubado. O D - Count® permite leitura imediata, não sendo necessária a incubação de amostras.

Pacotes	Métodos dependentes de cultivo (Provas de estufa)				Estria	Método independente de cultura
	Espalhamento					D- Count®
	Microrganismos Aeróbios		Microrganismos Anaeróbios			
sem incubação	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ⁻¹	D	ND
incubado a 55 ± 1 °C 7 dias	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ⁻¹	D	D
incubado a 30 ± 1 °C 3 dias	-	-	-	-	-	D
incubado a 30 ± 1 °C 15 dias	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ⁻¹	D	ND

ND - não determinado

D - determinado

3.2.3 Método de cálculo para variação de contagens

Considerando X e Y dois locais consecutivos de amostragem, sendo Y uma etapa posterior a X, o cálculo de variação de contagens de UFC/mL entre X e Y corresponde à diferença de contagens de UFC/mL entre eles (Eq.1).

$$\text{Variação} = Y - X \quad (\text{Eq. 1})$$

3.2.4 Análise estatística

Para avaliar a influência do tempo de produção e da percentagem de leite recuperado na variação microbiológica do leite, recorreu-se à elaboração de gráficos de dispersão, onde X,

representa a variável independente (tempo (h) ou leite recuperado incorporado (%)) e Y representa a variável dependente (Log UFC/mL das amostras G, H e/ou I).

Para a construção do gráfico tempo vs Log UFC/mL foram elaborados gráficos consoante a amostra em estudo (G, H e I) e o grupo microbiano. Para construção dos gráficos leite recuperado vs Log UFC/mL, foram apenas consideradas as amostras I, para cada grupo microbiano em estudo.

Através do programa *OriginPro 8.5* e recorrendo à ferramenta de análise estatística, construíram-se gráficos de dispersão e fez-se o ajuste dos dados através de regressão linear, através do *linear fitting* automático disponibilizado no programa (OriginLab Corporation, 2011). Este método permitiu obter o valor do fator de correlação ou coeficiente de Pearson (r) e o coeficiente de determinação (r^2). De forma sucinta, r indica a direção da relação entre as variáveis X e Y (positiva/negativa) e o seu valor indica a intensidade dessa mesma relação linear, já r^2 representa a proporção da variação dos valores Y atribuíveis à regressão linear em X, isto é, fornece uma estimativa da “força” da relação linear entre Y e X (Armstrong & Hilton, 2010).

Para a interpretação dos resultados, importa saber que r varia entre -1 e 1, e r^2 varia entre 0 e 1. No entanto, quando $r = 1$ todos os pontos de dados dispõem-se numa linha reta de inclinação positiva e não apresentam desvios entre eles (correlação positiva máxima). De forma oposta, quando $r = -1$ todos os pontos de dados estão numa linha reta de inclinação negativa (correlação negativa máxima). Quando $r = 0$ não há uma relação linear e os pontos de dados são espalhados mais ou menos aleatoriamente dentro do espaço bidimensional definido por X e Y. Os valores intermediários de r resultam de pontos de dados espalhados em torno de uma linha ajustada - quando r está próximo de 1 há uma menor dispersão e quando r está mais próximo de zero há um maior grau de dispersão dos pontos (Armstrong & Hilton, 2010).

O r^2 é auxiliador na interpretação dos valores de r obtidos, pois um elevado número de amostras e valores muito pequenos de r tornam-se significativos, podendo a variável X ser responsável apenas por uma pequena proporção da variação em Y. Desta forma, o coeficiente de determinação deve ser calculado e incluído na discussão sobre o significado de r . Quanto mais próximo de 1 o r^2 for, melhor será a qualidade de ajuste dos pontos (Armstrong & Hilton, 2010).

Para além disso, e no sentido de determinar se a correlação entre variáveis X e Y era significativa, recorreu-se ao programa estatístico SPSS (IBM Corp., 2019) para determinar o valor p, isto é, a probabilidade de significância. Assim, estipulou-se que quando $p \leq 0,05$: a correlação é estatisticamente significativa; caso contrário, ($p > 0,05$): a correlação não é estatisticamente significativa (Minitab Inc., 2019).

4 Resultados e Discussão

Os dados apresentados são resultado do estudo de seis produções, nas quais o número de lotes foi variável. Importa referir que a análise foi elaborada a partir de um estudo preliminar, que se realizou com o objetivo de identificar o(s) ponto (s) críticos no processo de produção de leite achocolatado. Este capítulo encontra-se dividido em três subcapítulos com o intuito de facilitar a sua leitura.

4.1 Avaliação da variação microbiológica no processo de produção de leite

Nesta secção pretende-se avaliar a variação da carga microbiana (UFC/mL) dos diferentes grupos microbianos analisados (FAM, FAT, EATM e EATT) nos diversos pontos da linha de produção do leite achocolatado (A-I). A partir dos resultados de UFC/mL obtidos para cada produção (Tabela II. 1 a Tabela II.6, Anexo II) foi possível construir graficamente a variação média de UFC/mL das produções em estudo, para cada categoria microbiana (Figura 13). Na Tabela II. 7 (Anexo II) estão os valores de desvio padrão relativos aos valores médios de UFC/mL das produções e na Tabela II. 8 (Anexo II), encontram-se todas as contagens abaixo do limite de deteção. As amostras nomeadas de A a I encontram-se identificadas pela data e hora de colheita, número de tanque, lote e temperatura, na Tabela II.9, no Anexo II.

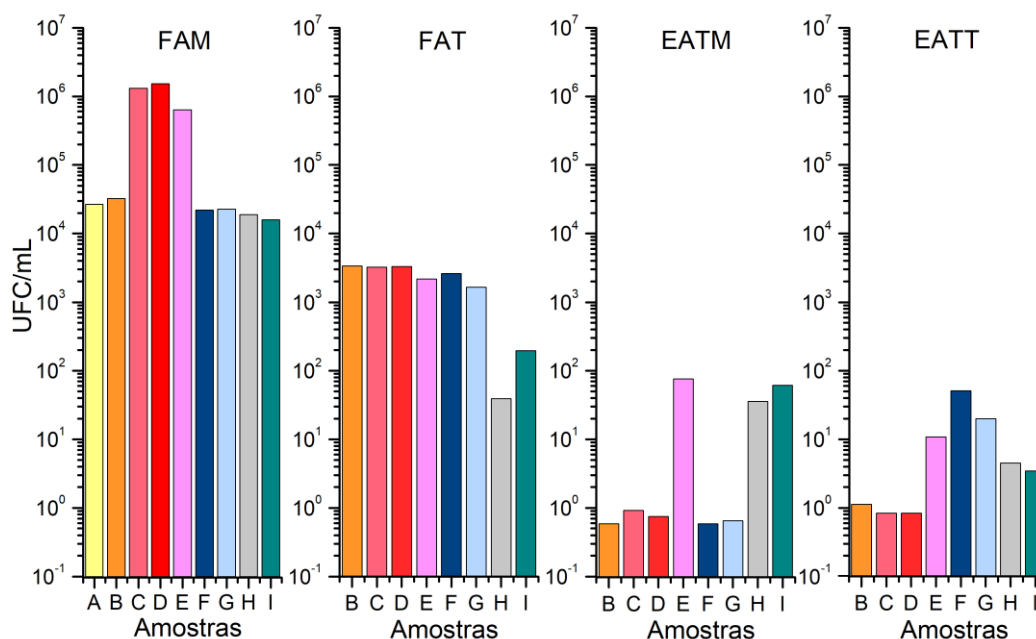


Figura 13. Sistematização gráfica das UFC/mL obtidas para os grupos microbianos em estudo. Os resultados obtidos para cada amostra são a média dos valores obtidos para essa mesma amostra em cada produção.

Analísaram-se 5 amostras A para FAM e 6 amostras B, C, D, E e F, para todos os grupos microbianos. As amostras G, H e I são resultado da média de UFC/mL correspondentes aos vários lotes existentes em cada produção, tendo sido analisado um total de 17 amostras para cada G, H e I, para cada categoria microbiana.

Através da Figura 13, verifica-se que o grupo microbiano maioritário em todas as amostras é a FAM, cujos valores médios variaram entre 10^4 e 10^6 UFC/mL. Embora o valor médio mais baixo tenha sido registado para as amostras H e I ($1,90 \times 10^4$ e $1,59 \times 10^4$ UFC/mL), estes valores não foram muito distintos dos registados para as amostras A, B, F e G. Em contraste, as amostras de leite proveniente dos tanques de leite recuperado (C, D e E) foram as que apresentaram os valores mais elevados de FAM, respetivamente na ordem de 10^6 , 10^6 e 10^5 UFC/mL. Os tanques de recolha de leite recuperado são estruturas móveis que facilmente circulam pela fábrica para os locais pretendidos, de modo a facilitar a deposição do leite. Estes tanques não são asséticos, encontrando-se abertos na parte superior, permitindo assim o contacto do leite com o ar. A temperatura da fábrica ronda os 20 °C, portanto, o facto de o ar entrar em contacto com o leite reaproveitado poderá levar à sua contaminação e/ou favorecer a multiplicação dos microrganismos aí presentes durante o período de armazenamento nos tanques. O facto de ter ocorrido uma diminuição do número de UFC/mL de E para F demonstra a eficácia do processo de termização do leite recuperado. No entanto, deve-se referir que esta diminuição da carga FAM também é devida ao efeito de diluição devido à junção do leite recuperado com leite em pó (E) ou com o leite cru termizado (B). No máximo, apenas 40% de F é constituído por E, sendo todo o volume restante constituído por B. A análise do impacto da percentagem de leite recuperado no processo de produção de leite UHT é apresentado na secção 4.3. Importa também referir que, embora ocorra um processo de termização de A para B, a variação da abundância de FAM foi pouco significativa, talvez devido à ótima qualidade do leite cru (A) à entrada do processo, com cerca de 10^4 UFC/mL, valor esse que é mantido após o processo térmico (B). Sugere-se uma revisão interna para este processo.

A densidade de FAT era, em média, inferior à de FAM observada ao longo do processo. A FAT apresentou valores médios entre 10^1 e 10^3 UFC/mL, tendo sido registados para as amostras H e I, os valores mais baixos, com uma ordem de grandeza de 10^1 e 10^2 UFC/mL, respetivamente. Contrariamente ao verificado para FAM, a abundância de FAT nas amostras B a E foi semelhante (na ordem de 10^3 UFC/mL), apresentando o maior valor encontrado para o grupo microbiano em questão.

Verificou-se ainda uma diminuição pouco significativa nas contagens de F para G, diminuição esta que apenas diz respeito aos diversos lotes, e poderá estar relacionada com o tempo de armazenamento do leite no tanque termizado. De G para H e I, verificou-se uma diminuição de contagens (em $2,61 \times 10^3$ UFC/mL e $1,65 \times 10^3$ UFC/mL, respetivamente), o que sugere que os aditivos do leite com chocolate não favorecem o desenvolvimento de organismos termotolerantes após os processos de termização do leite cru (B) e do leite recuperado com leite em pó (E), aquando do armazenamento nos tanques TQ-10- 13 (F/G).

Uma vez que o processo de produção de chocolate envolve vários passos de pasteurização, torna-se importante avaliar a fração de organismos produtores de esporos dentro dos grupos microbianos FAM e FAT. A densidade de EATM e EATT foi, em média, cerca de 10^4 e 10^2 UFC/mL mais baixa do que em FAM e FAT, respetivamente. Esta diminuição é consequência da inativação a 100 °C; o choque térmico provocado garante a destruição das células vegetativas da flora aeróbia mesófila e termófila, resistindo apenas os microrganismos formadores de esporos. Kent et al. (2016) testaram diferentes parâmetros para contagem de esporos mesófilos e termófilos detetados no leite cru e nos pós láteos, e concluíram que estes diferem significativamente consoante o método utilizado. Um dos quatro métodos usados para testar a presença de flora aeróbia mesófila e termófila, baseou-se a sua resistência a altas temperaturas, isto é, inativação a 100 °C durante 30 min. Provou-se ainda que os mesófilos apresentam um valor inferior aos termófilos, para a espécie em estudo, *Bacillus licheniformis*. O estudo revelou que, de um total de 326 isolados de pós e leites crus, verificou-se que 126 foram encontrados nos pós láteos (em que 6 isolados eram esporos mesófilos e 16 eram termófilos) e 200 no leite cru (onde foram detetados 12 isolados de esporos mesófilos e 33 de termófilos). Por outro lado, Ranieri & Boor (2009), isolaram 589 bactérias de leite UHT, das quais 346 pertenciam a géneros caracterizados como bactérias Gram-positivas formadoras de endósporos. Após 1, 7 e 10 dias após ultrapasteurização analisaram-se as amostras, e verificou-se que mais de 84% desses 346 isolados eram do género *Bacillus*. Concluíram também que 17 dias após o processo de UHT, mais de 92% dos isolados eram do género *Paenibacillus*, indicando estes géneros como os predominantes na deterioração do leite durante o armazenamento refrigerado.

De uma forma geral, verificou-se que as amostras B, C e D apresentaram uma densidade de EATM e EATT semelhante (em média $7,50 \times 10^{-1}$ UFC/mL, e $9,31 \times 10^{-1}$ UFC/mL), constatando-se um aumento de $7,51 \times 10^1$ UFC/mL e de $9,94 \times 10^0$ UFC/mL, respetivamente, no leite recuperado pronto (E) em relação a B, C e D. Este aumento poderá ser justificado pela adição de leite em pó ao leite recuperado podendo este, eventualmente, conter esporos de bactérias termorresistentes mesófilas e termófilas (ver possível justificação mais abaixo). Muito provavelmente devido ao efeito de diluição causado pela adição de leite cru termizado, os valores de EATM em F e G foram semelhantes aos de B-D. Por outro lado, ao contrário do esperado, verificou-se um aumento nas contagens de EATT de E ($1,09 \times 10^1$ UFC/mL) para F ($5,10 \times 10^1$ UFC/mL). Por último, na etapa correspondente à mistura do leite termizado cru com leite recuperado pronto com os ingredientes do leite achocolatado (H), verificou-se um aumento acentuado de EATM, que foi mantido em I. Este facto pode dever-se de igual forma à presença de esporos nos componentes sólidos adicionados no Almix 2, sendo um dos ingredientes maioritários o cacau (verificar explicação encontrada na literatura mais abaixo). Tal como verificado para FAT, para os esporos termófilos (EATT) também se verificou uma

diminuição nas contagens de G para H e I (em $1,54 \times 10^1$ UFC/mL e $1,65 \times 10^1$ UFC/mL, respetivamente).

Os desvios padrão registados para as várias amostras em estudo (Tabela II. 7, Anexo II) podem ser justificados pelo erro associado ao método de contagem (ou seja, o método por incorporação de agar poderá acarretar uma dificuldade extra na leitura das UFC/mL nas placas, devido ao crescimento dos microrganismos dentro do agar) e/ou pelo choque térmico provocado pela incorporação de agar nas placas que pretendiam avaliar a presença de microrganismos mesófilos, e/ou pela colheita indevida (por exemplo, incorreto acondicionamento após recolha e a recolha indevida associada a erros de operador, como o esquecimento da higienização da torneira e colheita de amostras sem um prévio escoamento de leite).

De forma a tentar compreender o aumento significativo de UFC/mL, registados para EATM e EATT, relativo à etapa de mistura de leite em pó com o leite recuperado, em relação a B, C e D, foi feita uma análise da literatura disponível no sentido de justificar e compreender tal aumento. Dessa forma, descobriu-se que as bactérias formadoras de esporos, particularmente, *Bacillus* e espécies deste tipo, são a maior preocupação no tratamento térmico, pois sabe-se que são organismos Gram positivos e formadores de esporos. Apesar de as suas formas vegetativas serem facilmente destruídas pelo calor, os seus esporos são capazes de tolerar altas temperaturas e suportar tratamentos de esterilização, o que poderá constituir uma ameaça à integridade do produto final (Deeth & Lewis, 2017). Os esporos são classificados em psicrófilos, mesófilos e termófilos, de acordo com a temperatura de crescimento. Embora os esporos termófilos sejam mais prevalentes em pós láteos (Watterson et al., 2014), verifica-se que *Bacillus licheniformis* é capaz de crescer tanto a temperaturas mesófilas como a temperaturas termófilas, sendo encontrado em todo o processo de produção e processamento de laticínios (Ivy et al., 2012). No que concerne aos esporos termófilos, segundo Murphy et al. (1999), os bacilos termófilos são baixos em número no leite cru, mas podem atingir números relativamente altos em pós resultantes de biotransferência de crescimento nos biofilmes a partir de superfícies nos evaporadores. Rückert et al. (2004) realizaram estudos de resistência ao calor e mostraram a resistência dos esporos *Bacillus sporothermodurans* ao tratamento UHT. Para além disso, constataram que o peróxido de hidrogénio, usado como desinfetante na indústria de laticínios, induz uma maior resistência ao calor das estirpes de *Bacillus sporothermodurans* cultivadas em laboratório até um certo nível. Por outro lado, Scott et al. (2007) concluíram que no leite em pó se verifica o aparecimento de um número elevado de esporos termófilos. O principal fator de crescimento das células vegetativas, e até mesmo da esporulação é a etapa de pré-aquecimento do leite no evaporador. Após esta conclusão determinou-se que este constitui o fator determinante e rejeitou-se o leite cru. Os principais contaminantes foram os esporos termófilos *Anoxybacillus flavithermus* e *Geobacillus* spp., e

foi também detetado *Bacillus licheniformis*. Concluíram ainda que uma possível fonte de bactérias termófilas era o *foulant*, que permaneceu na fábrica após uma *Clean-In-Place* (CIP), tendo sido identificado *Geobacillus* spp. Também Ronimus et al. (2003), identificaram diferentes espécies de *Bacillus*, nomeadamente *Bacillus sporothermodurans* em amostras de leite em pó colhidas em diferentes fábricas. Refira-se que *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus* spp. e *Bacillus* spp. pertencem à mesma família: *Bacillaceae* (Lopez-Brea et al., 2017). O aumento da quantidade de organismos formadores de esporos observado no presente trabalho poderá dever-se à presença destes nos pós adicionados. No entanto, Burgess et al. (2010) asseguram que, geralmente, os bacilos não são patogénicos e, embora o seu crescimento possa causar defeitos nos produtos láteos devido à produção de ácidos ou enzimas após a recombinação do pó, estima-se que, sob condições adequadas, o seu potencial real de deteriorar os produtos láteos é baixo, pois estes são armazenados a temperaturas abaixo dos 37 °C, às quais termófilos obrigatórios não crescerão.

Por outro lado, verificou-se também um aumento acentuado de esporos (EATM) no tanque de mistura, onde ocorre a junção de leite termizado com os vários ingredientes, sendo o principal o cacau. Segundo Barrile et al. (1971), diversos microrganismos estão presentes num elevado número durante a fermentação dos grãos do cacau, mas apenas os microrganismos do género *Bacillus* e microrganismos tipo *Bacillus* (parentes) sobrevivem a processos pós-colheita e ao processamento industrial. Estes microrganismos são formadores de endósporos, e em alguns casos de extrema resistência ao calor, sobrevivem aos processos industriais, causando deterioração no produto. Apesar disso, algumas espécies de *Bacillus* e relacionados (por exemplo *Geobacillus*) são microrganismos termófilos, o que pode justificar a sua não deteção quando incubados a 30 °C. No entanto, segundo Lima et al. (2011), no cacau em pó verifica-se, além de esporos de termorresistentes termófilos, a presença de esporos mesófilos, tendo sido detetados em 9 de 25 isolados. Para os termorresistentes mesófilos, foram encontrados sobreviventes até um tratamento térmico de 150 °C, durante 10 min, enquanto para termorresistentes termófilos foram encontrados sobreviventes até 110 °C, durante 10 min.

4.2 Comparação entre a variação microbiológica das amostras e dos pacotes

Neste subcapítulo é analisado o cruzamento dos dados obtidos, para as diversas amostras, com os resultados relativos ao produto final; havendo assim um seguimento de produção desde o leite cru (A) até ao produto final (P, Q, R, S, T e U). A denominação atribuída a cada pacote em estudo serve apenas para facilitar a visualização gráfica. Na Tabela III. 1, no Anexo III, está resumida toda a informação necessária que serve de identificação aos diversos pacotes.

Para determinar a esterilidade do produto final recorre-se à citometria de fluxo sendo analisados apenas pacotes incubados a 30 °C durante 15 dias, no laboratório da Lactogal. No entanto, com o objetivo de aprofundar o conhecimento em relação aos termófilos, neste estudo foram também analisados os pacotes incubados a 55 °C. Tal como referido na secção 3.2, foi apenas avaliado um pacote por cada lote produzido. Assim, no total foram analisados 17 pacotes para cada uma das combinações temperatura/tempo de incubação mencionadas. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Contagem de células viáveis/mL no produto final por citometria de fluxo, para diferentes períodos de incubação. O limite de deteção é 1 célula viável por mL.

	Período de incubação	
	30 °C, 15 dias	55 °C, 7 dias
P1	0	0
P4	10	16
P5	30	30
Q1	20	15
Q4	10	0
Q5	10	0
R1	49	0
R2	30	22
R3	20	0
S3	69	10
S6	79	30
T1	20	0
T2	30	0
T5	30	10
U4	10	30
U5	0	10
U6	0	20

Por rotina, a classificação das contagens pelo D-Count® (células viáveis totais) nos laboratórios da Lactogal é feita da seguinte forma: i) **negativo** - valores inferiores a 200 células viáveis/mL, indicando que o leite do lote tem boa qualidade e poderá ser comercializado, (ii) **suspeitos** - valores superiores a 200 e inferiores a 500 células viáveis/mL e (iii) **positivos** - valores superiores a 500 células viáveis/mL. Quando se obtêm suspeitos, repete-se a análise no momento e, caso dê um resultado negativo, o produto está conforme.

Caso contrário, para resultados positivos, há uma necessidade acrescida de realizar uma análise para os 30 pacotes produzidos imediatamente antes e depois do pacote em questão. O volume de amostras analisadas não é fixo, pois depende do volume de produção de leite diário. Apesar disso, em média, analisam-se cerca de 1500 amostras de leite (branco e chocolate) diariamente. Para o laboratório de microbiologia são recolhidos diariamente 5 pacotes de leite consecutivos nas seguintes situações: eventos de máquina (quando ocorrem empalmes de papel e de tira), arranques de máquina e finais de produção. Para além disso, são também colhidos 5 pacotes ao fim de cada 30 minutos.

Pela observação da Tabela 7, conclui-se que tanto os pacotes incubados a 30 °C, como os incubados a 55 °C revelaram valores negativos. Apesar de um pacote não ser representativo do respetivo lote, é correto afirmar que o tratamento utilizado foi adequado para a hora exata de produção. No sentido de aferir a conformidade dos vários lotes em estudo, foi possível cruzar os dados obtidos com os dados apurados pelo laboratório de controlo de qualidade da Lactogal, verificando-se, assim, a conformidade de todos os lotes em estudo e, consequentemente, a sua libertação para o mercado.

Seguidamente, apresentam-se gráficos que permitem a comparação entre organismos cultiváveis (amostras da produção, A-I para FAM e B-I para FAT, EATM e EATT) e células viáveis (produto final, P, Q, R, S, T ou U), para cada produção e respetiva combinação temperatura/tempo de incubação referidas (Figura 14 a Figura 19). Apesar de FAM e FAT dificilmente resistirem ao processo de UHT, também foram alvo de cruzamento de dados com os pacotes, tal como EATM e EATT, uma vez que o leite analisado no D-count® não é fervido previamente, o que pode indicar a presença tanto de flora normal aeróbia, como endósporos. Tal como mencionado na secção anterior, no Anexo II na Tabela II. 8., encontram-se representadas todas as contagens abaixo do limite de deteção.

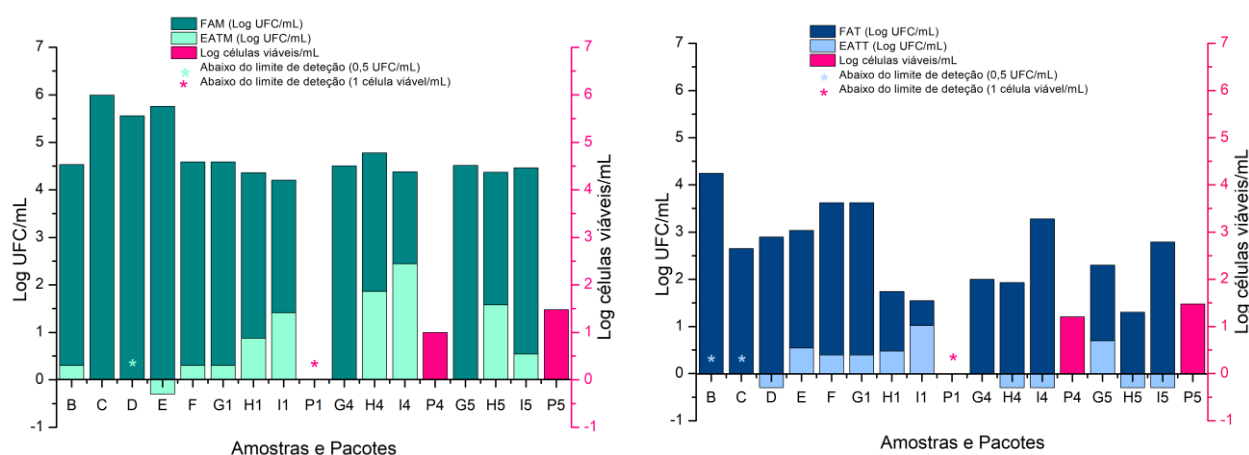


Figura 14. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 1. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.

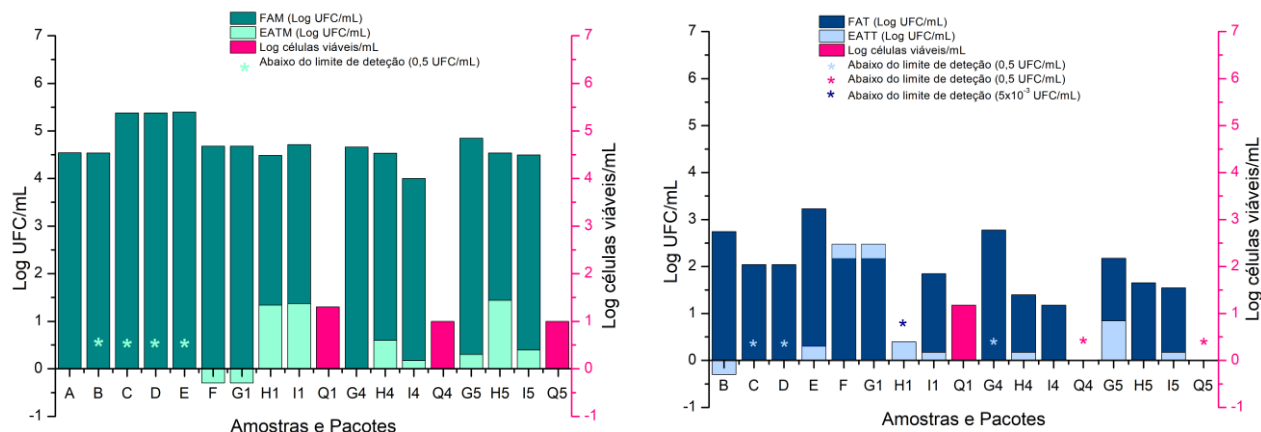


Figura 15. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 2. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.

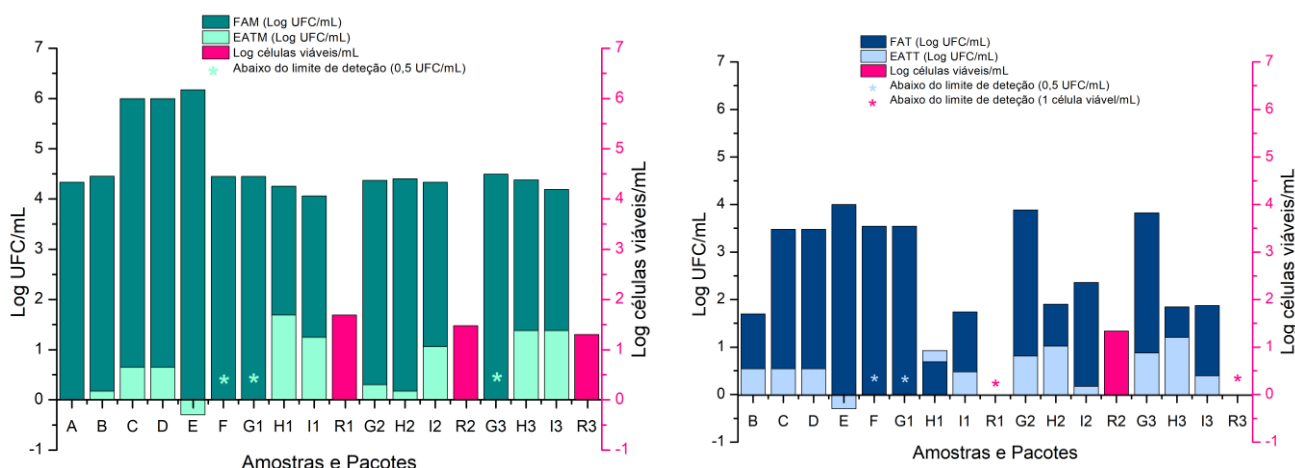


Figura 16. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 3. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.

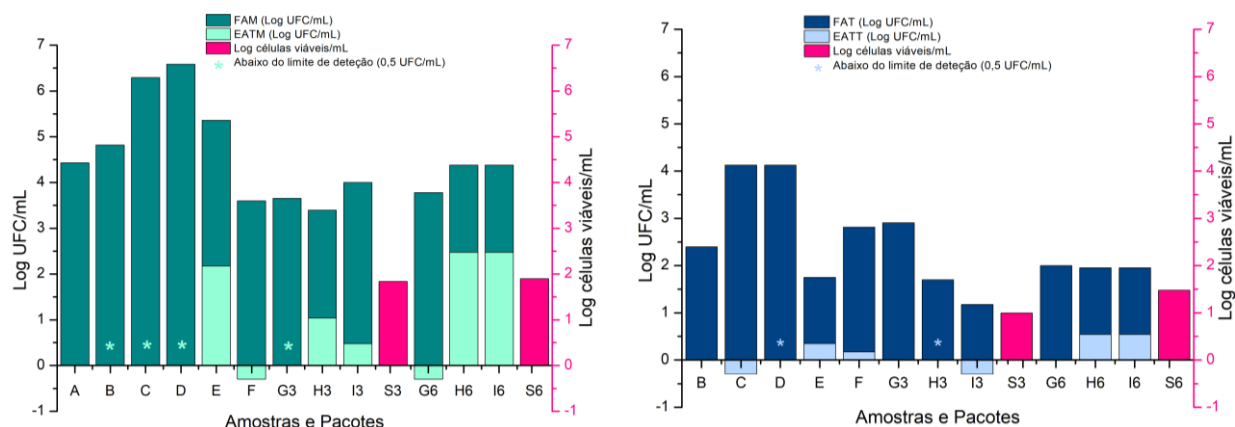


Figura 17. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 4. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.

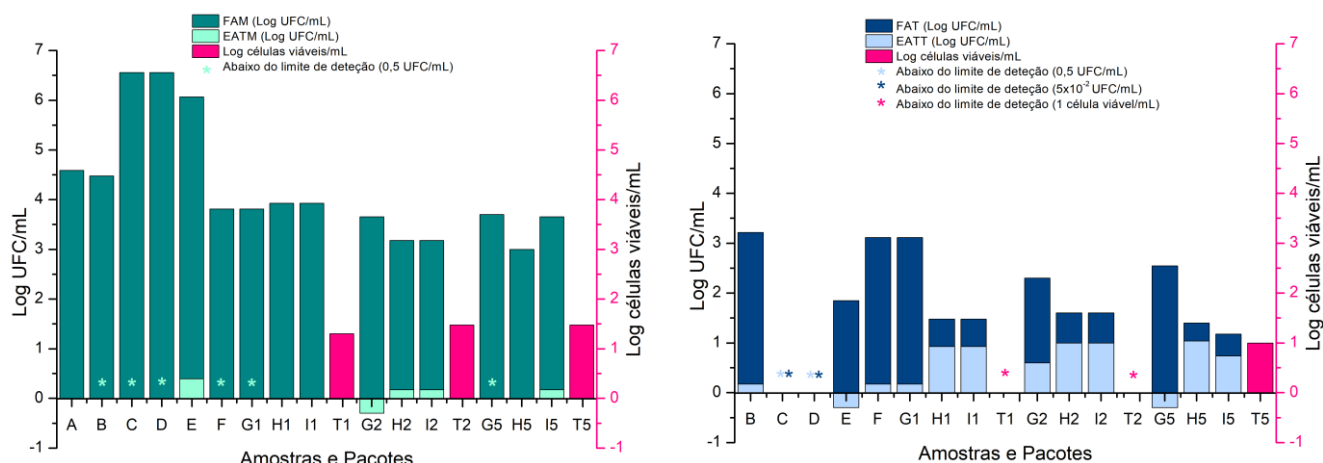


Figura 18. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 5. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.

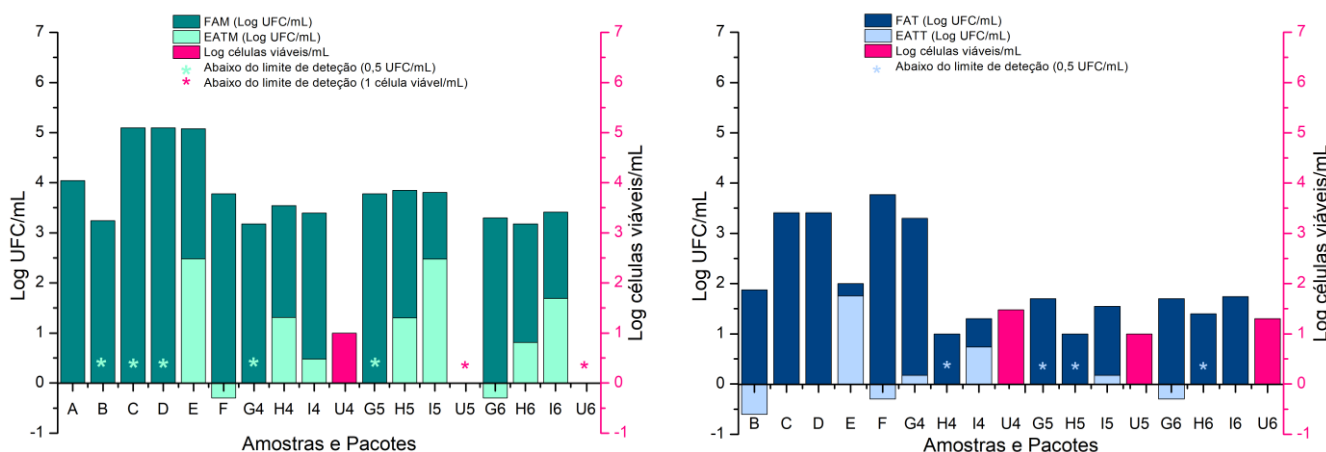


Figura 19. Comparação entre o logaritmo das UFC/mL e o logaritmo de células viáveis/mL obtidos para as amostras e pacotes, respetivamente, para a produção 6. Cada amostra e/ou pacote correspondem ao logaritmo da média entre dois valores de UFC/mL obtidos.

Através da observação das Figuras 14 à 19, conclui-se que o processo de tratamento final, isto é, o tratamento UHT, parece ser bastante eficiente na eliminação de grupos microbianos em estudo. Contudo, pontualmente, existem pacotes com maior abundância de células viáveis mesófilas e termófilas estando, no entanto, dentro dos valores considerados aceitáveis para a sua comercialização. Para o grupo mesófilo, os maiores valores de células viáveis encontrados foram para a produção 4, seguida da produção 3. Já para o grupo termófilo, verificaram-se valores bastante próximos e relativamente baixos. Mesmo assim, as produções 1, 4 e 6 apresentaram contagens mais elevadas, comparativamente às restantes. Desta forma, não há uma relação direta entre o número de contagens de UFC/mL observadas ao longo da produção (A-I) e as células viáveis registadas por citometria de fluxo no produto final (P, Q, R, S, T e U).

Não obstante, verificam-se algumas tendências. Observaram-se contagens de células viáveis inferiores às UFC/mL registadas para FAM e FAT ao longo do processo, com exceção das produções 4 a 6, em que se verifica uma proximidade entre os valores de UFC/mL FAT obtidos para as amostras I e as células viáveis contabilizadas nos pacotes (S3 e S4; U4, U5 e U6). Já para EATM e EATT, geralmente, as células viáveis são superiores às contagens obtidas por UFC/mL, no entanto há bastantes exceções, tornando difícil o resultado conclusivo quanto a estes grupos microbianos. Para além disso, verifica-se ainda que as contagens de células viáveis obtidas para os pacotes incubados a 30 °C apresentam, de um modo geral, valores superiores aos incubados a 55 °C (produções 2, 3, 4 e 5), estando em concordância com o observado para as UFC/mL ao longo do processo de produção (UFC/mL registadas para FAM são superiores às verificadas para FAT). Quanto às UFC/mL para os grupos mesófilos, verificaram-se valores superiores de FAM em relação a EATM, como seria expectável. Para os grupos termófilos o mesmo se verificou, com exceção das amostras F e G1 (produção 2) e amostra H1 (produção 3).

De modo a compreender a influência do leite em pó (E) e dos outros ingredientes desidratados incorporados no processo (H), foi feita uma comparação entre o número de células viáveis registadas no produto final e as UFC/mL obtidas ao longo da produção (B e H), de modo a compreender se valores superiores de UFC/mL implicavam valores superiores de células viáveis nos pacotes. Observando os resultados de UFC/mL obtidos para a amostra E e as células viáveis dos pacotes, constata-se que não há uma relação óbvia. Contudo, os pacotes da produção 4, incubados a 30 °C (maiores valores de células viáveis/mL encontrados para o grupo mesófilo), correspondem aos segundos valores de UFC/mL mais elevados registados para FAM; por outro lado, os pacotes da produção 3 incubados, também, a 30 °C (cujos valores de células viáveis foram os segundos mais elevados detetados para o grupo mesófilo) coincidem com os segundos maiores valores de UFC/mL encontrados para as amostras H, para o grupo EATM. Já para o grupo termófilo, verifica-se que os pacotes da produção 4 incubados a 55 °C (cujos valores de células viáveis foram os segundos mais elevados detetados para o grupo termófilo), apresentam os maiores valores de UFC/mL para o grupo FAT. No que diz respeito às amostras H, observou-se apenas para a produção 4, que valores superiores de UFC/mL coincidiam com os valores mais elevados de células viáveis no produto final; tendo-se verificado esta relação tanto para os grupos microbianos mesófilos como termófilos.

Deste modo, poder-se-á concluir que não existe uma relação óbvia entre as UFC/mL observadas ao longo da produção e as células viáveis/mL contabilizadas por citometria de fluxo, para os grupos EATM e EATT. No que diz respeito à análise por citometria de fluxo é possível identificar dois problemas associados que poderão influenciar as contagens e, logo, a sua análise. O primeiro é relativo aos erros inerentes à contagem realizada pelo equipamento;

que não garante que o número de células contadas seja relativo às células vivas, mas sim às células potencialmente viáveis. O segundo está relacionado com o tanque pulmão que poderá trazer problemas acrescidos às contagens de células viáveis/mL. Este, como mencionado na introdução, é um tanque que permite o armazenamento do leite, após o processo UHT, e imediatamente antes do leite ser encaminhado para o enchimento. Assim, ali poderá ocorrer mistura do leite entre lotes, dificultando a sua distinção após enchimento.

Por último, importa referir que foram realizadas provas de estufa no sentido de determinar a presença de microrganismos aeróbios e anaeróbios nos pacotes em estudo (P, Q, R, S, T e U). Para todos eles obtiveram-se contagens nulas, para uma determinação direta (sendo o limite de deteção $5,0 \times 10^{-1}$ UFC/mL), e não houve crescimento nas placas com estriamento (Tabela III. 2, Anexo III). A razão de existirem contagens de células viáveis por citometria de fluxo e não serem detetadas colónias, nos mesmos pacotes, pelo método de incorporação/estriamento, poderá ser devido ao stress a que as células estão expostas aquando do processo de tratamento UHT, e/ou devido ao facto meio utilizado não ser o ideal para as detetar e/ou ao erro associado à medição do equipamento de citometria de fluxo (D-count®) (por exemplo, uma célula morta poderá conter vestígios da enzima que permite a sua fluorescência e, consequentemente, a sua deteção). O motivo pelo qual não existe crescimento nas placas também poderá ser indicativo da presença de microrganismos termorresistentes, pelo simples facto de apresentarem mais restrições no crescimento em placa e se tornarem difíceis de detetar usando a técnica de incorporação (em placa com meio MPCA e no caso dos testes anaeróbios com meio RCA). Todos os pacotes em análise foram também avaliados quanto ao pH, registando-se valores dentro das gamas estipuladas, nomeadamente, $6,60 < \text{pH} < 7,0$ para pacotes sem incubação e $6,10 < \text{pH} < 7,0$ para pacotes incubados a 30 °C e 50 °C.

4.3 Avaliação da influência de fatores que afetam a variação microbiológica do leite com chocolate

Após o estudo microbiológico relativo às amostras e pacotes, é pertinente avaliar e compreender o impacto de dois fatores na variação microbiológica do leite com chocolate, nomeadamente o tempo de produção e a percentagem de leite recuperado. Desta forma, nesta secção é apresentado um estudo geral relativo ao período de tempo entre determinadas etapas da produção e às percentagens de leite recuperado incorporado, em função da carga microbiana. Nesse sentido, foi feita a correlação entre o número de horas de produção desde C-G, C-H e C-I e os Log UFC/mL. Seguidamente, foi feita uma análise que permite avaliar se a percentagem de leite recuperado influencia a carga microbiana do leite com chocolate. Para além disso, pensou-se que a temperatura poderia ter influência no processo de produção mas, como é controlada automaticamente, encontra-se sempre dentro dos parâmetros pretendidos. Assim, a temperatura do leite parece não ser um fator determinante nas variações microbiológicas (Tabela II. 9, no Anexo II).

4.3.1 Tempo no processo de produção de leite UHT

Nesta secção fez-se o cruzamento de dados tempo vs carga microbiana (Log UFC/mL) para os grupos microbianos em estudo: FAM, FAT, EATM e EATT, para as várias produções. Assim, nas Figuras 20, 21 e 22 encontram-se os gráficos de dispersão com ajuste de pontos dos Log UFC/mL para as amostras G, H, e I, respetivamente, em função do tempo de produção, para os grupos microbianos. As amostras em estudo são G, H e I, e as horas correspondem à duração entre as etapas C a G, C a H e C a I. É de referir que as amostras A e B não foram incluídas nesta análise. O motivo prende-se com o facto de as amostras A não terem sido analisadas quanto à abundância de FAT, EATM e EATT e de as amostras B não terem sido recolhidas no momento exato em que entram no tanque de termização, não tendo sido assim feito um rastreamento exato do tempo de B no interior dos TQ10-13. No Anexo IV, encontram-se os valores temporais de produção para as várias amostras e produções (Tabela IV. 1 a Tabela IV. 6.).

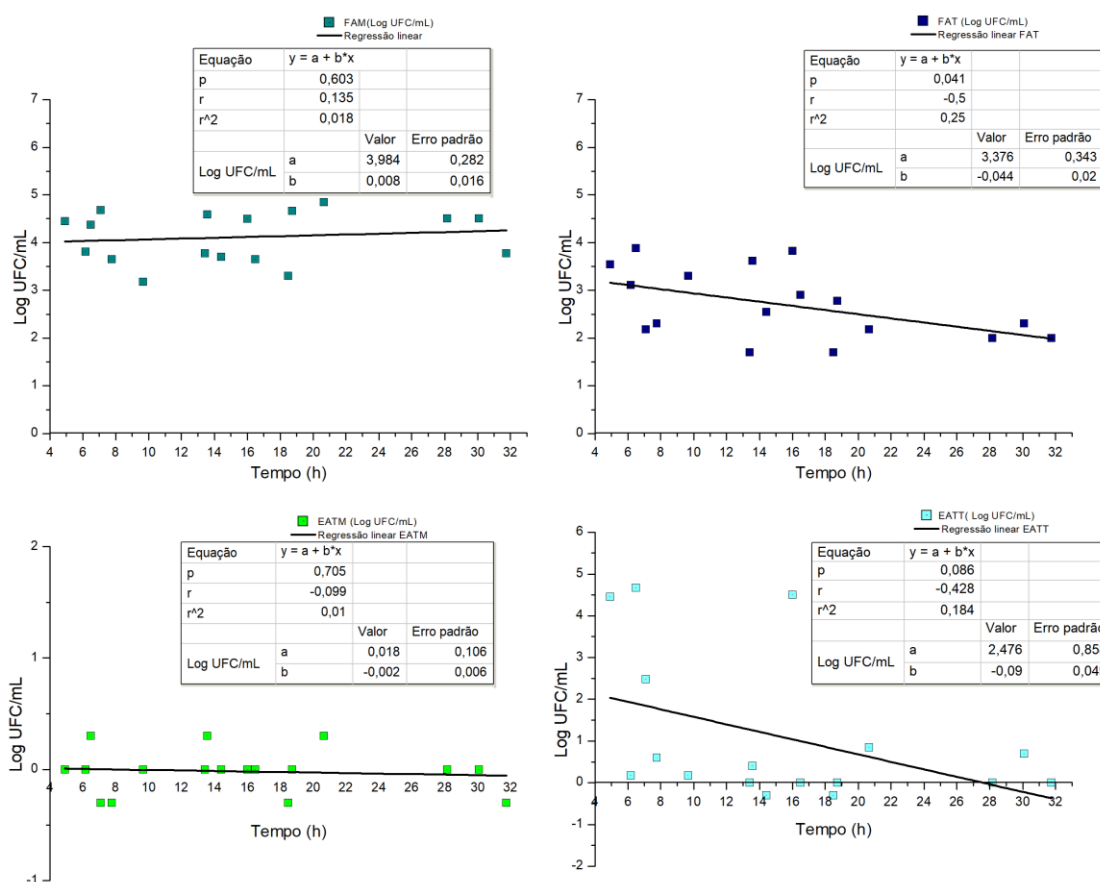


Figura 20. Gráficos representativos da correlação entre o tempo de produção das amostras G (C-G) e os Log UFC/mL das amostras G em estudo, para os 4 grupos microbianos.

De forma a avaliar a relação entre os tempos de produção das várias amostras G e as suas contagens de UFC/mL, recorreu-se à análise do coeficiente de correlação linear de Pearson, ao coeficiente de determinação e à probabilidade de significância. Assim, o esperado seria verificar-se um aumento do número de Log UFC/mL, com o aumento do tempo de produção. Através da Figura 20, observa-se apenas o esperado para FAM. Além disso, verifica-se que valores de r e r^2 são relativamente baixos, constando através do valor de p ($p > 0,05$) que a correlação entre o tempo de produção e o Log UFC/mL não é estatisticamente significativa. Uma vez que o coeficiente de Pearson apresenta valor negativo, contrariando assim a tendência esperada, o resultado é inconclusivo para os restantes grupos. Pode-se, portanto, concluir que o aumento do número de horas de produção parece não ter influência na carga microbiana do leite termizado (amostras G).

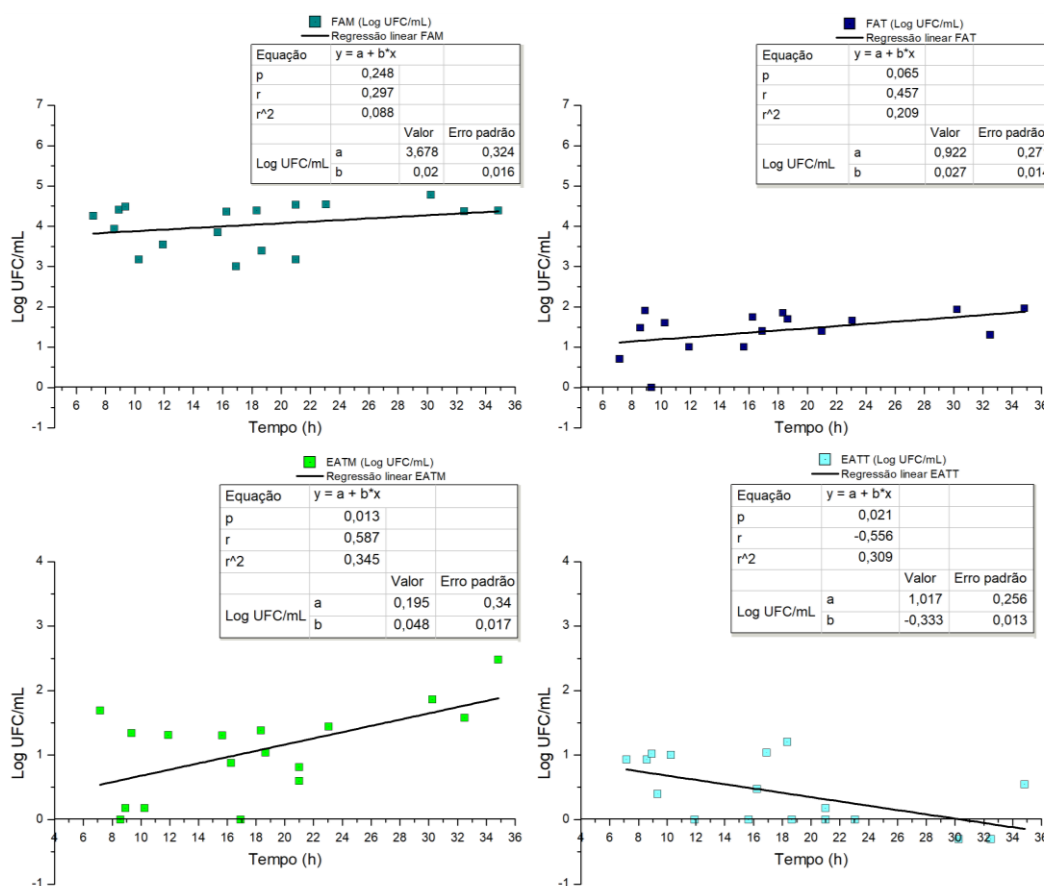


Figura 21. Gráficos representativos da correlação entre o tempo de produção das amostras H (C-H) e os Log UFC/mL das amostras H em estudo, para os 4 grupos microbianos.

Tal como observado na Figura 20 para FAM, na Figura 21 observam-se, para as amostras H, os resultados esperados para FAM, FAT e EATM, verificando-se valores de r positivos. Apesar disso, são baixos e inferiores a 0,60, sendo os valores de r^2 inferiores a 0,40, constatando-se uma qualidade de ajuste da regressão linear aos pontos baixa a moderada. Avaliando os valores de p , verifica-se para FAM e FAT valores superiores a 0,05, indicando assim, que a correlação entre o tempo de produção e o Log UFC/mL não é estatisticamente significativa. Por outro lado, para EATM verifica-se que $p < 0,05$, pelo que a correlação é estatisticamente significativa. Quanto ao grupo EATT, não é possível retirar uma conclusão, visto que apresentou um coeficiente de Pearson negativo, contrariando assim a tendência esperada. Deste modo, conclui-se para EATM que, aparentemente, poderá haver uma relação entre o número de horas de produção e o Log UFC/mL do leite com chocolate (amostras H). É ainda de ressaltar que os valores r e r^2 são bastante baixos, não sendo possível assegurar com certeza esta relação.

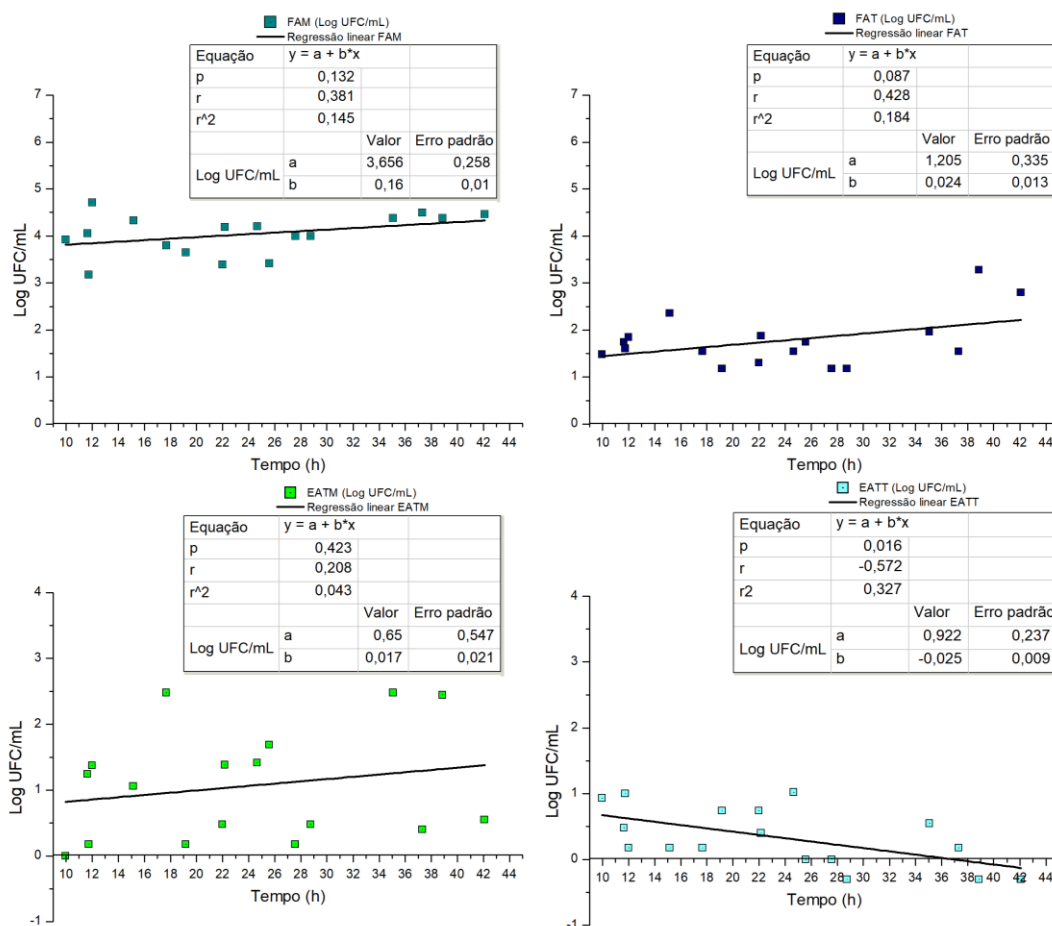


Figura 22. Gráficos representativos da correlação entre o tempo de produção das amostras I (C-I) e os Log UFC/mL das amostras I em estudo, para os 4 grupos microbianos.

Através da Figura 22, verifica-se para FAM, FAT e EATM um aumento de Log UFC/mL para um aumento do número de horas de produção (evidenciado pelo r positivo), tal como esperado. Apesar disso, os valores de r e r^2 são bastante baixos e o valor de p é superior a 0,05 - indicando, assim, que a correlação entre o tempo e o Log UFC/mL não é estatisticamente significativa. Para o grupo EATT não é possível retirar uma conclusão, uma vez que apresenta um valor de r negativo, contrariando a tendência esperada. À semelhança do observado para as amostras G e H, para as amostras I constata-se também que o tempo de produção não tem uma influência significativa na carga microbiana do leite com chocolate final (amostras I).

4.3.2 Percentagem de leite recuperado no processo de produção de leite UHT

É de notar que a percentagem de leite recuperado varia em cada produção, sendo comum realizar uma vez por semana uma produção com maior volume de leite recuperado (Tabela 8). Assim, esta secção prende-se com o estudo da influência do volume de leite recuperado, incorporado na produção, na qualidade do leite com chocolate final (amostra I). Dessa forma, na Figura 23 apresentam-se os gráficos de dispersão com ajuste de pontos dos Log UFC/mL para todas as amostras I, em função da percentagem de leite recuperado incorporado para os 4 grupos microbianos: FAM, FAT, EATM e EATT.

Tabela 8. Volume de leite recuperado (E) e percentagem de leite recuperado incorporado em cada produção.

	Volume de leite recuperado tratado (L)	Leite recuperado (%)
Produção 1	31200	27,4
Produção 2	22500	18,3
Produção 3	20800	21,6
Produção 4	32000	27,4
Produção 5	16050	11,3
Produção 6	11000	7,7

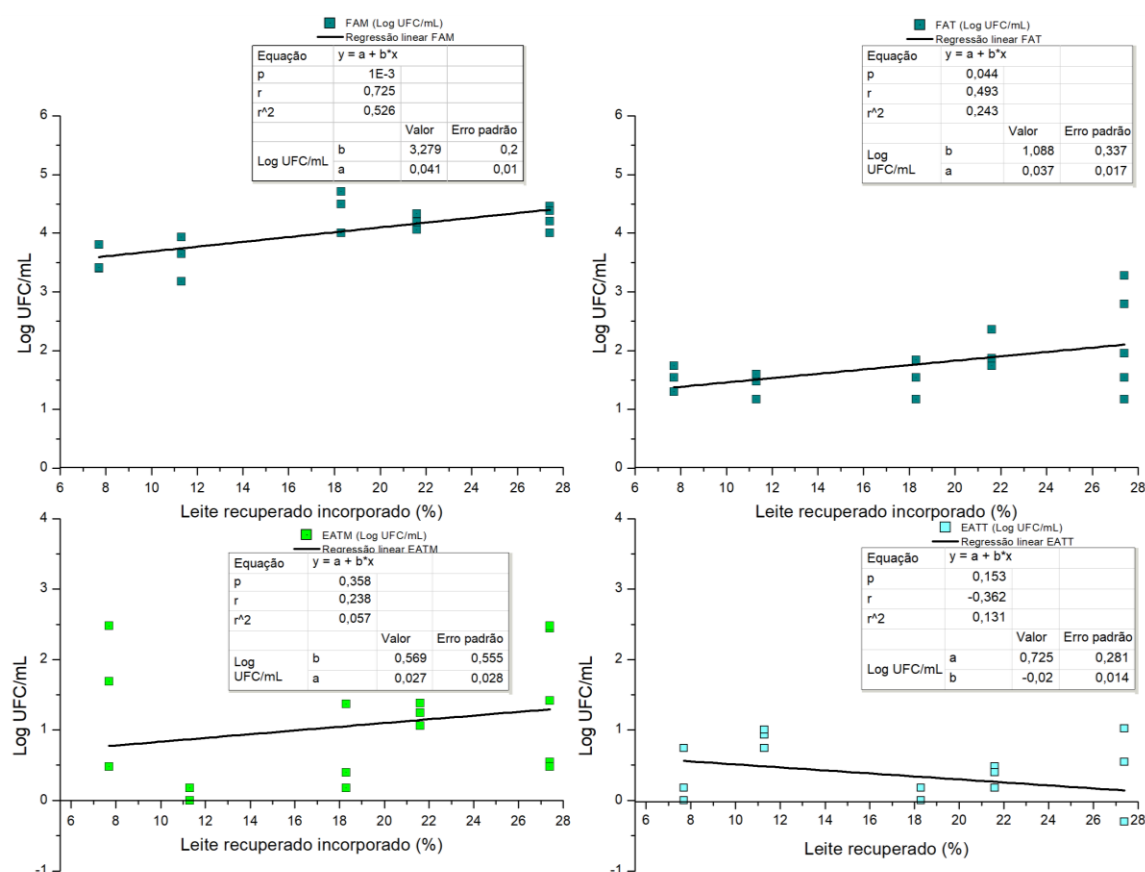


Figura 23. Gráficos representativos da correlação entre a percentagem de leite recuperado e os Log UFC/mL das amostras I em estudo, para os 4 grupos microbianos.

Através da Figura 23 é possível notar que para FAM e FAT, se verifica um coeficiente de Pearson de 0,73 e 0,49 e um valor de coeficiente de determinação de 0,53 e 0,24, respetivamente. Analisando o valor de p, verifica-se que, tanto para FAM como para FAT, este é inferior a 0,05, constatando-se que a correlação entre a percentagem de leite recuperado e o Log UFC/mL do leite com chocolate é estatisticamente significativa. Por outro lado, para EATM e EATT, a correlação não é estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Conclui-se, portanto, que para FAM há uma forte influência do leite recuperado na qualidade microbiana do leite com chocolate, verificando-se um aumento de UFC/mL com o aumento do leite recuperado incorporado na produção. Já para FAT, observa-se uma influência moderada.

5 Conclusões

O principal objetivo deste trabalho consistiu na deteção do(s) ponto(s) crítico(s) de controlo no processo de produção do leite com chocolate da marca Lactogal, através da avaliação da influência de dois parâmetros: o tempo de produção e a percentagem de leite recuperado incorporado no processo.

De forma geral, observou-se que em média a FAM apresenta valores de UFC/mL mais elevados comparativamente a todos os outros grupos em estudo, que variaram entre 10^4 e 10^6 UFC/mL, registando-se para as amostras de leite proveniente dos tanques de leite recuperado (C, D e E) os valores mais elevados de FAM, respetivamente na ordem de 10^6 , 10^6 e 10^5 UFC/mL. Tais valores podem ser influenciados pelo modo de recolha do leite recuperado e pelo arejamento dos tanques. Para EATM e EATT verificou-se a carga microbiana mais baixa, na ordem de 10^{-1} e 10^1 UFC/mL. Já para FAT, as contagens variaram na ordem de 10^1 e 10^3 UFC/mL. De um ponto de vista mais detalhado, observou-se, para FAM e EATM, um valor inferior de contagens no leite termizado (F) em relação às do leite recuperado (E), motivo que pode ser facilmente justificado pelo facto do leite termizado ser constituído por B e E. Como a carga microbiana em B é inferior a E, e como é adicionado um maior volume de B no tanque termizado (TQ 10-13) verifica-se um efeito de diluição, acompanhado também da termização de E, o que poderá levar a uma diminuição da sua carga microbiana. Em EATT e EATM, observou-se, em média, contagens superiores de UFC/mL no leite recuperado pronto (E), em relação a B, C e D. Este aumento poderá ser justificado pela adição de leite em pó ao leite recuperado (Almix 1), podendo, eventualmente, conter esporos de bactérias termorresistentes mesófilas, tal como demonstrado por vários autores supracitados. Em particular para o grupo EATM, mais concretamente para a amostra H, tornou a verificar-se uma contagem superior que se mantém em I. Desta vez, este aumento poderá estar relacionado com a mistura do leite termizado (G) com os vários ingredientes, sendo o composto maioritário o cacau (Almix 2), devido à possível presença de esporos termorresistentes. Apesar disso, verificam-se valores conformes e dentro dos limites aceitáveis.

Quando comparada a carga microbiana das amostras obtidas ao longo da produção (A-I) com a carga de células viáveis obtidas por citometria de fluxo para o produto final, constata-se que o processo de tratamento final do leite com chocolate (UHT) é bastante eficiente. Aparentemente, a carga microbiana contabilizada ao longo da produção parece não ter uma relação com a carga de células viáveis registada no produto final. Nos pacotes em estudo, verificou-se valores máximos de 79 células viáveis/mL para mesófilos e 30 células viáveis/mL para termófilos, sendo estes valores bastantes distantes dos considerados suspeitos (400 células viáveis/mL).

No que diz respeito ao objetivo principal do trabalho, o tempo parece não ter influência na variação da carga microbiana no leite e, consequentemente, na sua qualidade. Contrariamente, o leite recuperado incorporado em cada produção apresenta um forte e moderado impacto na carga microbiana do leite com chocolate, respetivamente, para os grupos microbianos FAM e FAT. Assim, para estes grupos, é possível concluir que quanto maior for o volume de leite recuperado incorporado no processo de produção, maior será a carga microbiana presente no leite com chocolate final, antes do tratamento UHT (amostra I), podendo afetar a sua qualidade. No sentido de aprofundar estudos em relação à influência do tempo na carga microbiana do leite com chocolate, sugere-se a realização de mais provas.

Desta forma, aconselha-se para trabalhos futuros a realização de um estudo a um maior número de amostras, que permita concluir com firmeza o impacto do leite recuperado na variação da carga microbiana. Contudo, deverão ser realizadas contagens num maior número de diluições. Um dos insucessos inerentes a este trabalho poderá estar associado ao facto de as contagens, na sua maioria, serem inferiores a 30 UFC o que, de certa forma, condicionou a análise, causando desvios padrão elevados entre amostras. Por outro lado, o facto de se obterem contagens baixas poderá estar associado à excelente qualidade do leite em estudo. Ainda assim, as variações obtidas podem ser justificadas pelo erro associado ao método de contagem (o método por incorporação de agar poderá dificultar a leitura de UFC nas placas, associada ao crescimento dos microrganismos no seu interior) e/ou pelo choque térmico provocado pela incorporação de agar nas placas, e/ou pela colheita realizada incorretamente.

Relativamente ao processo de termização à entrada da fábrica, concretamente entre a etapa de leite cru (A) e leite cru termizado (B), sugere-se uma revisão interna, uma vez que se verificou uma variação da abundância de FAM pouco significativa. Desta forma, será possível avaliar por amostragem a eficiência de termização.

Por último, e embora se observe uma variação da carga microbiana ao longo do processo de produção, influenciado pelos fatores apresentados, conclui-se que estes não afetam a qualidade do produto final. Assim, a combinação tempo/temperatura utilizada é eficaz e assegura a qualidade do produto final e, consequentemente, a segurança para o consumidor.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

Os objetivos propostos foram cumpridos, tendo sido detetados pontos críticos no processo de produção do leite com chocolate da marca Lactogal, como a fase de introdução de pós na produção (de leite em pó (Almix 1), de cacau, outros ingredientes (Almix 2)) e introdução de leite recuperado. Relativamente à avaliação da influência do tempo de produção e da percentagem de leite recuperado incorporado no processo, seria necessário o estudo aprofundado de um maior volume de amostras e produções, no sentido de compreender a importância real destes dois fatores. Pelos resultados analisados, depreende-se que o tempo de produção no processo não aparenta ter um impacto na qualidade microbiana do leite com chocolate. Por outro lado, verificou-se para FAM e FAT, que o volume de leite recuperado incorporado em cada produção traduz-se num aumento da carga microbiana do leite.

6.2 Limitações e Trabalho Futuro

Decorrente das inúmeras variáveis existentes no processo produção, como o tempo de produção, incorporação de ingredientes desidratados, leite cru com qualidade distinta diariamente, incorporação de leite recuperado em diferentes volumes e de qualidades diferentes, torna-se difícil retirar conclusões acerca do processo. Assim, sugere-se para trabalho futuro a supervisão das amostragens, no sentido de garantir a correta colheita e acondicionamento, a realização de um maior volume de amostragens, bem como um maior número de diluições e, possivelmente, a realização de método por espalhamento. Recomenda-se ainda a identificação de microrganismos presentes no leite com chocolate para as diversas etapas do processo, com o objetivo de compreender a evolução microbiológica do produto, detetando quais os que, recorrentemente, sobrevivem ao processo. Por fim, aconselha-se à Lactogal a revisão do tratamento de termização à entrada do processo, visto que se verifica uma abundância de flora aeróbia mesófila no leite cru e leite cru termizado semelhante, tendo pouca relevância na diminuição da carga microbiana mesófila.

6.3 Apreciação Final

Do ponto de vista pessoal, foi uma mais valia estagiar na Lactogal, onde foi possível conhecer o processo e funcionamento da indústria de laticínios de modo a poder aplicar o conhecimento adquirido na FEUP. Assim, o trabalho desenvolvido veio evidenciar a importância de determinadas etapas do processo de produção de chocolate na qualidade e segurança do produto final.

Referências

- Anderson, M., Hinds, P., Hurditt, S., Miller, P., McGrowder, D., & Alexander-Lindo, R. (2011). The microbial content of unexpired pasteurized milk from selected supermarkets in a developing country. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(3), 205-211.
- Armstrong, R., & Hilton, A. (2010). *Statistical analysis in microbiology: StatNotes*. Wiley-Blackwell.
- Barrile, J., Osrovar, K., & Keeney, P. (1971). Microflora of cocoa beans and after roasting at 150 °C. *Journal of Milk and Food Technology*, 34(7), 369-371.
- Barros, L., Sógliã, S., Ferreira, M., Rodrigues, M., & Branco, M. (2011). Aerobic and anaerobic bacteria and *Candida* species in crude milk. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(8), 206-212.
- bioMérieux. (2017). *CHEMUNEX® Rapid microbiology analyzers*. Acedido a 25 de Maio, 2020, em <https://www.biomerieux-usa.com/industry/chemunex-analyzers>
- Burgess, S., Lindsay, D., & Flint, S. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 215-225.
- Bylund, G. (1995). Dairy Processing Handbook. In *Tetra Pak Processing Systems*. Tetra Pak Processing Systems.
- Caroli, A., Poli, A., Ricotta, D., Banfi, G., & Cocchi, D. (2011). Invited review: Dairy intake and bone health: A viewpoint from the state of the art1. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5249-5262.
- Chen, L., Daniel, R., & Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders (review). *International Dairy Journal*, 13(4), 255-275.
- Cousin, M. (1982). Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection*, 45, 172-207.
- Deeth, H., & Lewis, M. (2017). *High Temperature Processing of Milk and Milk Products*. Wiley-Blackwell.
- Deeth, H., & Smithers, G. (2018). *Heat Treatment of Milk-Overview*. IDF Factsheet 001/2018-02. Acedido a 20 de Abril, 2020, em https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2018/02/Factsheet-001_Heat-treatment-1-1.pdf
- Delgado, S., Rachid, C., Fernández, E., Rychlik, T., Alegría, Á., Peixoto, R., & Mayo, B. (2013). Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food Microbiology*, 36(1), 103-111.
- Durazzo, A. (Ed.). (2018). Milk: Bioactive Components and Role in Human Nutrition. *Beverages*, 95-104.
- FAO. (2020a). *Dairy Market Review*. Acedido a 20 de Abril, 2020, em <http://www.fao.org/3/ca8341en/CA8341EN.pdf>
- FAO. (2020b). *Milk and milk products*. Acedido a 20 de Abril, 2020, em <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/en/>.
- FDA. (2019). *CFR - Code of Federal Regulations*. U.S. Food and Drug Administration. Acedido a 20 de Abril, 2020, em <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=133.3>
- Francisquini, J., Martins, E., Silva, P., Schuck, P., Perrone, Í., & Carvalho, A. (2017). Reação de Maillard: uma revisão. *Revista Do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 72(1), 48-57.
- Gleeson, D., O'Connell, A., & Jordan, K. (2013). Review of potential sources and control of thermotolerant bacteria in bulk-tank milk. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 52(2), 217-227.
- Griffiths, M. (2000). Milk and unfermented milk products. In B. Lund, T. Baird-Parker, & G. Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*, 507-534. Aspen Publishers, Inc.
- Guetouache, M., Guessas, B., & Medjekal, S. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(10), 115-122.
- Hanson, M., Wendorff, W., & Houck, K. (2005). Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores. *Journal of Food Protection*, 68(7), 1484-1486.

- IBM Corp. (2019). *IBM SPSS Statistics for Macintosh* (26.0).
- IDF. (1990). *Handbook on milk collection in warm developing countries*. International Dairy Federation, 57-129.
- Ivy, R., Ranieri, M., Martin, N., den Bakker, H., Xavier, B., Wiedmann, M., & Boor, K. (2012). Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1853-1864.
- Kent, D., Chauhan, K., Boor, K., Wiedmann, M., & Martin, N. (2016). Spore test parameters matter: Mesophilic and thermophilic spore counts detected in raw milk and dairy powders differ significantly by test method. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5180-5191.
- Kung, B., Anderson, G., Paré, S., Tucker, A., Vien, S., Wright, A., & Goff, H. (2018). Effect of milk protein intake and casein-to-whey ratio in breakfast meals on postprandial glucose, satiety ratings, and subsequent meal intake. *Journal of Dairy Science*, 101, 8688-8701.
- Kwak, H., Lee, W., & Lee, M. (2012). Revisiting lactose as an enhancer of calcium absorption. *International Dairy Journal*, 22(2), 147-151.
- Lactogal. (2015). *Relatório de Responsabilidade Corporativa Lactogal 2015*. Acedido a 20 de Abril, 2020, em http://www.lactogal.pt/ResourcesUser/Responsabilidade_Social/RRC_Lactogal_2015_site.pdf%0A%0A
- Lactogal. (2019). *Lactogal*. Acedido a 20 de Abril, 2020, em <http://www.lactogal.pt/homepage.aspx>
- Lima, L., Kamphuis, H., Nout, M., & Zwietering, M. (2011). Microbiota of cocoa powder with particular reference to aerobic thermoresistant spore-formers. *Food Microbiology*, 28(3), 573-582.
- Lopez-Brea, S., Gómez-Torres, N., & Arribas, M. (2017). Spore-forming bacteria in dairy products. In *Microbiology in dairy processing*, 11-36. Wiley-Blackwell.
- Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., & Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), 270-279.
- Mesfine, S., Feyera, T., & Mohammed, O. (2015). Microbiological Quality of Raw Cow's Milk from Four Dairy Farms in Dire Dawa City, Eastern Ethiopia. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 10(1), 09-14.
- Michaëlsson, K., Wolk, A., Langenskiöld, S., Basu, S., Lemming, E. W., Melhus, H., & Byberg, L. (2014). Milk intake and risk of mortality and fractures in women and men: Cohort studies. *BMJ*, 349(g6015).
- Mills, S., O'sullivan, O., Hill, C., Fitzgerald, G., & Ross, R. P. (2010). The changing face of dairy starter culture research: From genomics to economics. *International Journal of Dairy Technology*, 63(2), 149-170.
- Mimosa. (2019). *O leite na alimentação*. Acedido a 20 de Abril de 2020, em <https://mimosa.com.pt/cnam/o-leite-na-alimentacao/origem-e-processamento/leite/>
- Minitab Inc. (2019). *Minitab Support*. Interpret the Key Results for Correlation. Acedido a 6 de Junho, 2020, em <https://support.minitab.com/en-us/minitab-express/1/help-and-how-to/modeling-statistics/regression/how-to/correlation/interpret-the-results/>
- Muleta, T. (2016). The microbiology of Ethiopian milk and milk product: review. *International Journal of Current Research*, 8(7), 34606-34611.
- Murphy, P., Lynch, D., & Kelly, P. (1999). Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *International Journal of Dairy Technology*, 52, 45-50.
- Nickerson, T. (1960). Chemical Composition of Milk. *Journal of Dairy Science*, 10(5), 598-606.
- OECD, & FAO. (2019). Dairy and dairy products. In *Agricultural outlook 2019-2028*, 180-189. Acedido a 20 de Abril, 2020, em http://www.fao.org/3/CA4076EN/CA4076EN_Chapter7_Dairy.pdf
- Oliveira, A., & Caruso, J. (1983). *Leite: obtenção, controle de qualidade e processamento*. ESALDQ/USP.
- OriginLab Corporation. (2011). *OriginPro 8.5* (No. 2011).
- Parente, E., & Cogan, T. (2004). Starter Cultures: General Aspects. In Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., & Guinee, T. Guinee Physics and Microbiology (3ª Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics*

- and Microbiology* , 1, 123-147. Academic Press.
- Pastor, O. (2017). *Apontamentos de bioquímica microbiana*.
- Proleite. (2017). Proleite, Acedido a 20 de Abril, 2020, em <https://www.proleite.pt/visita-dos-associados-da-proleite-as-instalacoes-fabris-da-lactogal-em-modivas/>
- Ramesh, C., Arun, K., & Nagendra, S. (2015). *Dairy processing and quality assurance* (2ª Ed.). Wiley-Blackwell.
- Ranieri, M., & Boor, K. (2009). Short communication: Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the united States. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4833-4840.
- Ronimus, R., Parker, L., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, H. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), 45-61.
- Rückert, A., Ronimus, R., & Morgan, H. (2004). A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *International Journal of Food Microbiology*, 96(3), 263 - 272.
- Samaržija, D., Zamberlin, Š., & Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 62(2), 77-79.
- Scott, S., Brooks, J., Rakonjac, J., Walker, K., & Flint, S. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2), 109-117.
- Shimamura, T., & Uke, H. (2012). Maillard reaction in milk - Effect of heat treatment. In *Milk Protein*. InTech.
- Tetra Pak International S.A. (n.d.). *Material das embalagens cartonadas da Tetra Pak*. Acedido a 20 de Abril, 2020, em <https://www.tetrapak.com/pt/packaging/materials>
- Thorning, T., Raben, A., Tholstrup, T., Soedamah-Muthu, S., Givens, I., & Astrup, A. (2016). Milk and dairy products: Good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence. *Food and Nutrition Research*, 60(32527).
- Van Boekel, M. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*, 62(4), 403-414.
- Watterson, M., Kent, D., Boor, K., Wiedmann, M., & Martin, N. (2014). Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 2487-2497.
- Witthuhn, M., Lücking, G., Atamer, Z., Ehling-Schulz, M., & Hinrichs, J. (2011). Thermal resistance of aerobic spore formers isolated from food products. *International Journal of Dairy Technology*, 64(4).
- Zadow, J. (1986). Lactose hydrolysed dairy products. *Food Technology in Australia*, 38(11), 460-462.

ANEXOS

Anexo I Considerações relativas aos procedimentos

Considerações importantes para a realização dos procedimentos aquando da análise das amostras em estudo

No sentido de determinar as UFC presentes na amostra de leite recolhida pelos trabalhadores, é necessário ter em consideração os seguintes tópicos:

- I. Realizar sucessivas diluições 1:10 (Figura I. 1), de modo a garantir a fidelidade dos resultados, ou seja, que as UFC em cada caixa de Petri variem entre 30 e 300. Para a realização das diluições utilizou-se solução de Ringer e através do método observado na foram atingidas as diluições necessárias. Entre cada diluição realizada é necessário homogeneizar a solução. É ainda de referir que as diferentes amostras (de A a I) exigiram a realização de diferentes diluições dependendo do tipo de caracterização microbiológica feita.
- II. Identificar devidamente os tubos de ensaio e as placas de Petri a serem analisadas.
- III. As amostras de leite recolhidas foram inoculadas em placas de Petri seguindo o método de inoculação por incorporação ou por meio de estriamento (cujo é utilizado para verificar o crescimento a partir de uma única colónia, semeando uma colónia em placa seguindo os movimentos exemplificados na Figura I. 2).
- IV. As amostras de leite recolhidas ao longo do processo de produção são analisadas sem incubação prévia. Por outro lado, os produtos finais são avaliados sem incubação e com incubação (7 dias a 55 °C e 15 dias 30 °C).
- V. As análises realizadas às amostras e aos pacotes (placas e/ou tubos de ensaio) são incubadas durante 72 h a 30 ± 1 °C (microrganismos aeróbios) ou durante 72 h a 55 ± 1 °C (microrganismos anaeróbios).

Findo o período de incubação, é possível proceder à contagem das UFC nas placas de Petri e calcular o número de células viáveis na amostra inicial (UFC/mL).

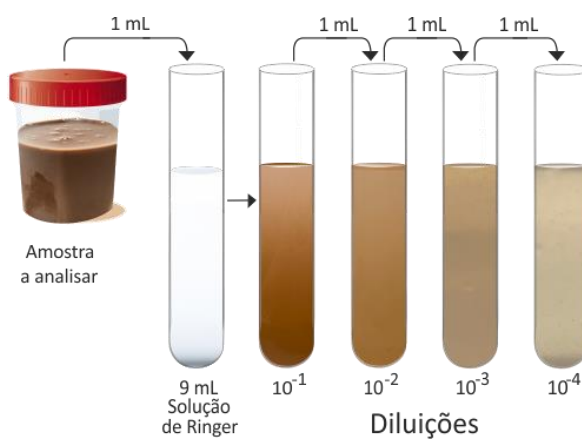


Figura I. 1. Esquematização do procedimento de diluições sucessivas utilizando solução de Ringer.

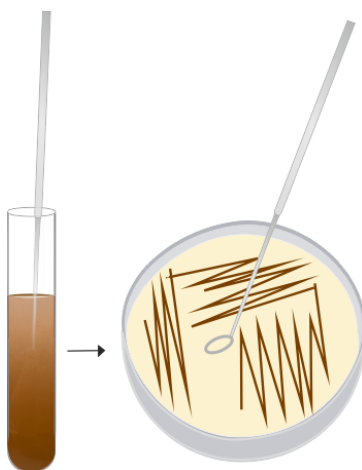


Figura I. 2. Esquematização do método de inoculação por estriamento realizado no produto final.

Anexo II Dados relativos às amostras

Tabela II. 1. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 1.

Amostras	FAM	FAT	EATM	EATT
B	$3,40 \times 10^4$	$1,76 \times 10^4$	$2,00 \times 10^0$	0
C	$9,80 \times 10^5$	$4,45 \times 10^2$	$1,00 \times 10^0$	0
D	$3,60 \times 10^5$	$7,85 \times 10^2$	0	$5,00 \times 10^{-1}$
E	$5,70 \times 10^5$	$1,09 \times 10^3$	$5,00 \times 10^{-1}$	$3,50 \times 10^0$
F	$3,90 \times 10^4$	$4,15 \times 10^3$	$2,00 \times 10^0$	$2,50 \times 10^0$
G1	$3,90 \times 10^4$	$4,15 \times 10^3$	$2,00 \times 10^0$	$2,50 \times 10^0$
G4	$3,20 \times 10^4$	$1,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^0$	$1,00 \times 10^0$
G5	$3,25 \times 10^4$	$2,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^0$	$5,00 \times 10^0$
H1	$2,30 \times 10^4$	$5,50 \times 10^1$	$7,50 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$
H4	$6,00 \times 10^4$	$8,50 \times 10^1$	$7,25 \times 10^1$	$5,00 \times 10^{-1}$
H5	$2,35 \times 10^4$	$2,00 \times 10^1$	$3,80 \times 10^1$	$5,00 \times 10^{-1}$
I1	$1,60 \times 10^4$	$3,50 \times 10^1$	$2,60 \times 10^1$	$1,05 \times 10^1$
I4	$2,40 \times 10^4$	$1,91 \times 10^3$	$2,78 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$
I5	$2,90 \times 10^4$	$6,20 \times 10^2$	$3,50 \times 10^0$	$5,00 \times 10^{-1}$

Tabela II. 2. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 2.

Amostras	FAM	FAT	EATM	EATT
A	$3,50 \times 10^4$	ND	ND	ND
B	$3,45 \times 10^4$	$5,50 \times 10^2$	0	$5,00 \times 10^{-1}$
C	$2,40 \times 10^5$	$1,10 \times 10^2$	0	0
D	$2,40 \times 10^5$	$1,10 \times 10^2$	0	0
E	$2,50 \times 10^5$	$1,70 \times 10^3$	0	$2,00 \times 10^0$
F	$4,80 \times 10^4$	$1,50 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$	$3,00 \times 10^2$
G1	$4,80 \times 10^4$	$1,50 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$	$3,00 \times 10^2$
G4	$4,60 \times 10^4$	$6,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^0$	0
G5	$7,05 \times 10^4$	$1,50 \times 10^2$	$2,00 \times 10^0$	$7,00 \times 10^0$
H1	$3,05 \times 10^4$	0	$2,20 \times 10^1$	$2,50 \times 10^0$
H4	$3,40 \times 10^4$	$2,50 \times 10^1$	$4,00 \times 10^0$	$1,50 \times 10^0$
H5	$3,45 \times 10^4$	$4,50 \times 10^1$	$2,75 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$
I1	$5,15 \times 10^4$	$7,00 \times 10^1$	$2,35 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$
I4	$1,00 \times 10^4$	$1,50 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$	$1,00 \times 10^0$
I5	$3,15 \times 10^4$	$3,50 \times 10^1$	$2,50 \times 10^0$	$1,50 \times 10^0$

ND - Não Determinado

Tabela II. 3. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 3.

Amostras	FAM	FAT	EATM	EATT
A	$2,15 \times 10^4$	ND	ND	ND
B	$2,85 \times 10^4$	$5,00 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$	$3,50 \times 10^0$
C	$1,00 \times 10^6$	$3,01 \times 10^3$	$4,50 \times 10^0$	$3,50 \times 10^0$
D	$1,00 \times 10^6$	$3,01 \times 10^3$	$4,50 \times 10^0$	$3,50 \times 10^0$
E	$1,49 \times 10^6$	$1,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-1}$
F	$2,80 \times 10^4$	$3,50 \times 10^3$	0	0
G1	$2,80 \times 10^4$	$3,50 \times 10^3$	0	0
G2	$2,35 \times 10^4$	$7,70 \times 10^3$	$2,00 \times 10^0$	$6,50 \times 10^0$
G3	$3,15 \times 10^4$	$6,65 \times 10^3$	0	$7,50 \times 10^0$
H1	$1,80 \times 10^4$	$5,00 \times 10^0$	$4,90 \times 10^1$	$8,50 \times 10^0$
H2	$2,55 \times 10^4$	$8,00 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$	$1,05 \times 10^1$
H3	$2,40 \times 10^4$	$7,00 \times 10^1$	$2,40 \times 10^1$	$1,60 \times 10^1$
I1	$1,15 \times 10^4$	$5,50 \times 10^1$	$1,75 \times 10^1$	$3,00 \times 10^0$
I2	$2,15 \times 10^4$	$2,30 \times 10^2$	$1,15 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$
I3	$1,55 \times 10^4$	$7,50 \times 10^1$	$2,40 \times 10^1$	$2,50 \times 10^0$

ND - Não Determinado

Tabela II. 4. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 4.

Amostras	FAM	FAT	EATM	EATT
A	$2,70 \times 10^4$	ND	ND	ND
B	$6,55 \times 10^4$	$2,50 \times 10^2$	0	$1,00 \times 10^0$
C	$1,96 \times 10^6$	$1,33 \times 10^4$	0	$5,00 \times 10^{-1}$
D	$3,83 \times 10^6$	$1,33 \times 10^4$	0	0
E	$2,30 \times 10^5$	$5,63 \times 10^1$	$1,51 \times 10^2$	$2,25 \times 10^0$
F	$4,00 \times 10^3$	$6,50 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$	$1,50 \times 10^0$
G3	$4,50 \times 10^3$	$8,00 \times 10^2$	0	$1,00 \times 10^0$
G6	$6,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$	$1,00 \times 10^0$
H3	$2,50 \times 10^3$	$5,00 \times 10^1$	$1,10 \times 10^1$	0
H6	$2,40 \times 10^4$	$9,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^2$	$3,50 \times 10^0$
I3	$1,00 \times 10^4$	$1,50 \times 10^1$	$3,00 \times 10^0$	$5,00 \times 10^{-1}$
I6	$2,40 \times 10^4$	$9,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^2$	$3,50 \times 10^0$

ND - Não Determinado

Tabela II. 5. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 5.

Amostras	FAM	FAT	EATM	EATT
A	$3,85 \times 10^4$	ND	ND	ND
B	$3,00 \times 10^4$	$1,65 \times 10^3$	0	$1,50 \times 10^0$
C	$3,60 \times 10^6$	0	0	0
D	$3,60 \times 10^6$	0	0	0
E	$1,17 \times 10^6$	$7,00 \times 10^1$	$2,50 \times 10^0$	$5,00 \times 10^{-1}$
F	$6,50 \times 10^3$	$1,30 \times 10^3$	0	$1,50 \times 10^0$
G1	$6,50 \times 10^3$	$1,30 \times 10^3$	0	$1,50 \times 10^0$
G2	$4,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$	$4,00 \times 10^0$
G5	$5,00 \times 10^3$	$3,50 \times 10^2$	0	$5,00 \times 10^{-1}$
H1	$8,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$	$8,50 \times 10^0$
H2	$1,50 \times 10^3$	$4,00 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$	$1,00 \times 10^1$
H5	$1,00 \times 10^3$	$2,50 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$	$1,10 \times 10^1$
I1	$8,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$	$8,50 \times 10^0$
I2	$1,50 \times 10^3$	$4,00 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$	$1,00 \times 10^1$
I5	$4,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$	$5,50 \times 10^0$

ND - Não Determinado

Tabela II. 6. Valores de UFC/mL obtidos para a produção 6.

Amostras	FAM	FAT	EATM	EATT
A	$1,10 \times 10^4$	ND	ND	ND
B	$1,75 \times 10^3$	$7,50 \times 10^1$	0	$2,50 \times 10^{-1}$
C	$1,25 \times 10^5$	$2,57 \times 10^3$	0	$1,00 \times 10^0$
D	$1,25 \times 10^5$	$2,57 \times 10^3$	0	$1,00 \times 10^0$
E	$1,20 \times 10^5$	$1,00 \times 10^2$	$3,01 \times 10^2$	$5,65 \times 10^1$
F	$6,00 \times 10^3$	$5,90 \times 10^3$	$5,00 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-1}$
G4	$1,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	0	$1,50 \times 10^0$
G5	$6,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^1$	0	0
G6	$2,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^1$	$5,00 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-1}$
H4	$3,50 \times 10^3$	$1,00 \times 10^1$	$2,05 \times 10^1$	0
H5	$7,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	0
H6	$1,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^1$	$6,50 \times 10^0$	0
I4	$2,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^0$	$5,50 \times 10^0$
I5	$6,40 \times 10^3$	$3,50 \times 10^1$	$3,00 \times 10^2$	$1,50 \times 10^0$
I6	$2,60 \times 10^3$	$5,50 \times 10^1$	$4,90 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$

ND - Não Determinado

Tabela II. 7. Média dos valores de UFC/mL obtidos para as seis produções e respetivos desvios-padrão (DP).

Amostras	FAM		FAT		EATM		EATT	
	UFC/mL	DP	UFC/mL	DP	UFC/mL	DP	UFC/mL	DP
A	$2,66 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B	$3,24 \times 10^4$	$2,03 \times 10^4$	$3,36 \times 10^3$	$7,00 \times 10^3$	$5,83 \times 10^{-1}$	$9,17 \times 10^{-1}$	$1,13 \times 10^0$	$1,28 \times 10^0$
C	$1,32 \times 10^6$	$1,30 \times 10^6$	$3,24 \times 10^3$	$5,09 \times 10^3$	$9,17 \times 10^{-1}$	$1,80 \times 10^0$	$8,33 \times 10^{-1}$	$1,37 \times 10^0$
D	$1,53 \times 10^6$	$1,72 \times 10^6$	$3,29 \times 10^3$	$5,05 \times 10^3$	$7,50 \times 10^{-1}$	$1,84 \times 10^0$	$8,33 \times 10^{-1}$	$1,37 \times 10^0$
E	$6,38 \times 10^5$	$5,65 \times 10^5$	$2,17 \times 10^3$	$3,90 \times 10^3$	$7,58 \times 10^1$	$1,26 \times 10^2$	$1,09 \times 10^1$	$2,24 \times 10^1$
F	$2,19 \times 10^4$	$1,91 \times 10^4$	$2,61 \times 10^3$	$2,26 \times 10^3$	$5,83 \times 10^{-1}$	$7,36 \times 10^{-1}$	$5,10 \times 10^1$	$1,22 \times 10^2$
G	$2,28 \times 10^4$	$2,05 \times 10^4$	$1,65 \times 10^3$	$2,42 \times 10^3$	$6,47 \times 10^{-1}$	745×10^{-1}	$2,00 \times 10^1$	$7,22 \times 10^1$
H	$1,90 \times 10^4$	$1,60 \times 10^4$	$3,91 \times 10^1$	$2,87 \times 10^1$	$3,57 \times 10^1$	$7,08 \times 10^1$	$4,53 \times 10^0$	$5,09 \times 10^0$
I	$1,59 \times 10^4$	$1,32 \times 10^4$	$1,97 \times 10^2$	$4,65 \times 10^2$	$6,16 \times 10^1$	$1,11 \times 10^2$	$3,44 \times 10^0$	$3,36 \times 10^0$

ND - Não determinado

Tabela II. 8. Valores de UFC/mL abaixo do limite de deteção.

Grupo Microbiano	Amostra	Produção	Limite de deteção
FAT	H1	2	$3,50 \times 10^{-3}$
FAT	C	5	$5,00 \times 10^{-2}$
FAT	D	5	$5,00 \times 10^{-2}$
EATM	D	1	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	B	2	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	C	2	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	D	2	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	E	2	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	F	3	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	G1	3	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	G3	3	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	B	4	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	C	4	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	D	4	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	G3	4	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	B	5	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	C	5	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	D	5	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	F	5	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	G1	5	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	G5	5	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	B	6	$5,00 \times 10^{-1}$

Tabela II. 8. Continuação.

Grupo Microbiano	Amostra	Produção	Limite de deteção
EATM	C	6	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	D	6	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	G4	6	$5,00 \times 10^{-1}$
EATM	G5	6	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	B	1	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	C	1	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	C	2	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	D	2	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	G4	2	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	F	3	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	G1	3	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	D	4	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	H3	4	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	C	5	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	D	5	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	G5	6	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	H4	6	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	H5	6	$5,00 \times 10^{-1}$
EATT	H6	6	$5,00 \times 10^{-1}$

Tabela II. 9. Dados relativos às amostras recolhidas ao longo do processo de produção, entre eles, identificação (ID), data e hora de colheita, tanque, lote e temperatura do leite no interior do tanque (T).

Produção	ID	Data de Colheita	Hora de Colheita	Tanque	Lote	T (°C)
1	B	01/03/2020	08:45	11	2TQ1104809	3,7
	C	29/02/2020	21:15	85	2TQ8501508	4,4
	D	01/03/2020	03:20	85	2TQ8501508	4,6
	E	01/03/2020	06:20	06	ND	3,5
	F	01/03/2020	10:50	11	2TQ1104809	3,8
	G1	01/03/2020	10:50	11	2TQ1104809	3,8
	G4	02/03/2020	01:25	11	2TQ1104809	4,9
	G5	02/03/2020	03:20	11	2TQ1104809	5,2
	H1	01/03/2020	13:30	47	2TQ4704221	5,5
	H4	02/03/2020	03:30	50	2TQ5003493	6,4
	H5	02/03/2020	05:45	47	2TQ4704222	6,9
	I1	01/03/2020	21:55	47	2TQ4704221	6,0
	I4	02/03/2020	12:07	50	2TQ5003493	6,7
	I5	02/03/2020	15:20	47	2TQ4704222	7,2
2	A	02/03/2020	14:40	02	2TQ0251378	4,5
	B	02/03/2020	15:00	12	2TQ1204722	4,0
	C	02/03/2020	13:40	85	2TQ851509	4,2
	D	02/03/2020	13:40	85	2TQ851509	4,2
	E	02/03/2020	16:30	02	2TQ8501509	3,8
	F	02/03/2020	20:45	12	2TQ1204722	4,5
	G1	02/03/2020	20:45	12	2TQ1204722	4,5
	G4	03/03/2020	08:25	12	2TQ1204722	5,1
	G5	03/03/2020	10:20	12	2TQ1204722	5,4
	H1	03/03/2020	23:00	48	2TQ4803981	5,7
	H4	03/03/2020	10:40	47	2TQ4704223	6,4
	H5	03/03/2020	12:44	48	2TQ4803982	6,6
	I1	03/03/2020	01:40	48	2TQ4803981	5,8
	I4	03/03/2020	17:15	47	2TQ4704223	6,7
	I5	03/03/2020	03:00	48	2TQ4803982	7,2

ND - Não determinado

Tabela II.9. Continuação.

Produção	ID	Data de Colheita	Hora de Colheita	Tanque	Lote	T (°C)
3	A	03/03/2020	22:00	01	2TQ0112353	4,4
	B	03/03/2020	22:30	10	2TQ1005031	3,7
	C	03/03/2020	19:50	84	2TQ8401522	4,2
	D	03/03/2020	19:50	84	2TQ8401522	4,2
	E	03/03/2020	23:20	05	2TQ8401522	4,1
	F	04/03/2020	00:45	10	2TQ1005031	4,0
	G1	04/03/2020	00:45	10	2TQ1005031	4,0
	G2	04/03/2020	02:20	10	2TQ1005031	4,2
	G3	04/03/2020	11:50	10	2TQ1005031	4,9
	H1	04/03/2020	03:00	50	2TQ5003495	5,7
	H2	04/03/2020	04:45	47	2TQ4704224	6,3
	H3	04/03/2020	14:10	50	2TQ5003496	6,8
	I1	04/03/2020	07:28	50	2TQ5003495	5,8
	I2	04/03/2020	11:00	47	2TQ4704224	6,6
	I3	04/03/2020	18:00	50	2TQ5003496	6,9
4	A	08/03/2020	05:30	05	2TQ0511501	4,7
	B	08/03/2020	06:00	10	2TQ1005036	3,7
	C	08/03/2020	00:00	85	2TQ8501512	4,7
	D	08/03/2020	05:00	85	2TQ8501512	4,8
	E	08/03/2020	07:30	85	2TQ8501512	4,8
	F	08/03/2020	11:00	10	2TQ1005036	3,9
	G3	08/03/2020	16:30	10	2TQ1005036	4,0
	G6	09/03/2020	07:45	10	2TQ1005036	5,0
	H3	08/03/2020	18:40	48	2TQ4803987	5,8
	H6	09/03/2020	10:50	49	2TQ4903840	7,5
	I3	09/03/2020	04:45	48	2TQ4803987	6,2
	I6	09/03/2020	10:50	49	2TQ4903840	7,5

Tabela II.9. Continuação.

Produção	ID	Data de Colheita	Hora de Colheita	Tanque	Lote	T (°C)
5	A	09/03/2020	14:45	04	2TQ0411620	5,4
	B	09/03/2020	14:50	10	2TQ1005037	3,9
	C	09/03/2020	13:35	85	2TQ8501513	4,3
	D	09/03/2020	13:35	85	2TQ8501513	4,3
	E	09/03/2020	15:00	85	2TQ8501513	6,0
	F	09/03/2020	19:45	10	2TQ1005037	4,0
	G1	09/03/2020	19:45	10	2TQ1005037	4,0
	G2	09/03/2020	21:20	10	2TQ1005037	4,1
	G5	10/03/2020	04:00	10	2TQ1005037	4,3
	H1	09/03/2020	22:10	47	2TQ4704228	5,6
	H2	09/03/2020	23:50	48	2TQ4803988	5,5
	H5	10/03/2020	06:30	47	2TQ4704229	6,1
	I1	10/03/2020	23:33	47	2TQ4704228	5,7
	I2	10/03/2020	01:20	48	2TQ4803988	5,6
	I5	10/03/2020	08:45	47	2TQ4704229	6,3
6	A	10/03/2020	06:55	04	2TQ0411622	4,7
	B	10/03/2022	06:55	11	2TQ1104818	3,6
	C	10/03/2024	10:50	84	2TQ8401526	4,2
	D	10/03/2025	10:50	84	2TQ8401526	4,2
	E	10/03/2026	12:15	84	2TQ8401526	6,4
	F	10/03/2027	14:30	11	2TQ1104818	4,1
	G4	10/03/2031	20:30	11	2TQ1104818	4,4
	G5	11/03/2020	00:15	11	2TQ1104818	4,7
	G6	11/03/2020	05:20	11	2TQ1104818	5,1
	H4	10/03/2020	22:45	48	2TQ4803990	6,0
	H5	11/03/2020	02:30	49	2TQ4903843	6,4
	H6	11/03/2020	07:50	50	2TQ5003503	6,7
	I4	11/03/2020	08:50	48	2TQ4803990	6,4
	I5	11/03/2020	04:30	49	2TQ4903843	6,8
	I6	11/03/2020	12:25	50	2TQ5003503	6,9

Anexo III Dados relativos aos pacotes

Tabela III. 1. Dados relativos aos pacotes, onde a identificação do pacote é representada por ID.

Produção	ID	Tanque	Data de produção	Hora de produção	Validade	Máquina	Lote
1	P1	47	01/03/2020	22:22:49	29/07/20	615	2007293064
	P4	50	02/03/2020	12:31:15	30/07/20	617	2007303040
	P5	47	02/03/2020	16:20:55	30/07/20	617	2007303040
2	Q1	48	03/03/2020	02:52:00	31/07/20	615	2007313037
	Q4	47	03/03/2020	18:45:11	31/07/20	618	2007313038
	Q5	48	04/03/2020	04:17:26	01/08/20	615	2008013045
3	R1	50	04/03/2020	07:42:49	01/08/20	615	2008013045
	R2	47	04/03/2020	11:31:46	01/08/20	617	2008013046
	R3	50	04/03/2020	19:09:16	01/08/20	617	2008013046
4	S3	48	09/03/2020	06:36:23	05/08/20	616	2008063040
	S6	49	09/03/2020	11:45:08	06/08/20	616	2008063040
5	T1	47	10/03/2020	00:21:14	07/08/20	615	2008073020
	T2	48	10/03/2020	02:18:48	07/08/20	616	2008073021
	T5	48	10/03/2020	18:08:09	07/08/20	616	2008073021
6	U2	47	11/03/2020	02:18:25	08/08/20	618	2008083063
	U4	48	11/03/2020	09:04:31	08/08/20	617	2008083070
	U5	49	11/03/2020	06:33:10	08/08/20	618	2008083063
	U6	50	11/03/2020	13:18:06	08/08/20	616	2008083077

Tabela III. 2. Resultados das provas de estufa obtidos para cada pacote, identificados pelas letras de P a U (ID), utilizando o método de referência.

ID	SEM INCUBAÇÃO						7 DIAS a 55 °C						15 DIAS a 30 °C					
	pH	Microrganismos Anaeróbios		Microrganismos Aeróbios		Estria	pH	Microrganismos Anaeróbios		Microrganismos Aeróbios		Estria	pH	Microrganismos Anaeróbios		Microrganismos Aeróbios		Estria
		0,1 mL	1 mL	0,1 mL	1 mL			0,1 mL	1 mL	0,1 mL	1 mL			0,1 mL	1 mL	0,1 mL	1 mL	
P1	6,78	0	0	0	0	N	6,65	0	0	0	0	N	6,75	0	0	0	0	N
P4	6,76	0	0	0	0	N	6,66	0	0	0	0	N	6,75	0	0	0	0	N
P5	6,77	0	0	0	0	N	6,68	0	0	0	0	N	6,74	0	0	0	0	N
Q1	6,77	0	0	0	0	N	6,67	0	0	0	0	N	6,76	0	0	0	0	N
Q4	6,78	0	0	0	0	N	6,68	0	0	0	0	N	6,75	0	0	0	0	N
Q5	6,77	0	0	0	0	N	6,67	0	0	0	0	N	6,75	0	0	0	0	N
R1	6,8	0	0	0	0	N	6,66	0	0	0	0	N	6,74	0	0	0	0	N
R2	6,79	0	0	0	0	N	6,66	0	0	0	0	N	6,75	0	0	0	0	N
R3	6,78	0	0	0	0	N	6,65	0	0	0	0	N	6,76	0	0	0	0	N
S3	6,78	0	0	0	0	N	6,67	0	0	0	0	N	6,76	0	0	0	0	N
S6	6,77	0	0	0	0	N	6,68	0	0	0	0	N	6,76	0	0	0	0	N
T1	6,77	0	0	0	0	N	6,68	0	0	0	0	N	6,76	0	0	0	0	N
T2	6,77	0	0	0	0	N	6,66	0	0	0	0	N	6,76	0	0	0	0	N
T5	6,77	0	0	0	0	N	6,67	0	0	0	0	N	6,75	0	0	0	0	N
U4	6,77	0	0	0	0	N	6,66	0	0	0	0	N	6,75	0	0	0	0	N
U5	6,77	0	0	0	0	N	6,67	0	0	0	0	N	6,75	0	0	0	0	N
U6	6,77	0	0	0	0	N	6,66	0	0	0	0	N	6,76	0	0	0	0	N

Anexo IV Dados microbiológicos vs dados temporais

Tabela IV. 1. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (1, 4 e 5) da produção 1 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.

Amostras	Horas desde o início de produção	FAM (UFC/mL)	FAT (UFC/mL)	EATM (UFC/mL)	EATT (UFC/mL)
C	0,0	$9,80 \times 10^5$	$4,45 \times 10^2$	$1,00 \times 10^0$	0
D	6,1	$3,60 \times 10^5$	$7,85 \times 10^2$	0	$5,00 \times 10^{-1}$
E	9,1	$5,70 \times 10^5$	$1,09 \times 10^3$	$5,00 \times 10^{-1}$	$3,50 \times 10^0$
F	13,6	$3,90 \times 10^4$	$4,15 \times 10^3$	$2,00 \times 10^0$	$2,50 \times 10^0$
G1	13,6	$3,90 \times 10^4$	$4,15 \times 10^3$	$2,00 \times 10^0$	$2,50 \times 10^0$
G4	28,2	$3,20 \times 10^4$	$1,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^0$	$1,00 \times 10^0$
G5	30,1	$3,25 \times 10^4$	$2,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^0$	$5,00 \times 10^0$
H1	16,3	$2,30 \times 10^4$	$5,50 \times 10^1$	$7,50 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$
H4	30,3	$6,00 \times 10^4$	$8,50 \times 10^1$	$7,25 \times 10^1$	$5,00 \times 10^{-1}$
H5	32,5	$2,35 \times 10^4$	$2,00 \times 10^1$	$3,80 \times 10^1$	$5,00 \times 10^{-1}$
I1	24,7	$1,60 \times 10^4$	$3,50 \times 10^1$	$2,60 \times 10^1$	$1,05 \times 10^1$
I4	38,9	$2,40 \times 10^4$	$1,91 \times 10^3$	$2,78 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$
I5	42,1	$2,90 \times 10^4$	$6,20 \times 10^2$	$3,50 \times 10^0$	$5,00 \times 10^{-1}$

Tabela IV. 2. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (1, 4 e 5) da produção 2 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.

Amostras	Horas desde o início de produção	FAM (UFC/mL)	FAT (UFC/mL)	EATM (UFC/mL)	EATT (UFC/mL)
C	0,0	$2,40 \times 10^5$	$1,10 \times 10^2$	0	0
D	0,0	$2,40 \times 10^5$	$1,10 \times 10^2$	0	0
E	2,8	$2,50 \times 10^5$	$1,70 \times 10^3$	0	$2,00 \times 10^0$
F	7,1	$4,80 \times 10^4$	$1,50 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$	$3,00 \times 10^2$
G1	7,1	$3,80 \times 10^4$	$1,50 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$	$3,00 \times 10^2$
G4	18,8	$4,60 \times 10^4$	$6,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^0$	0
G5	20,7	$7,05 \times 10^4$	$1,50 \times 10^2$	$2,00 \times 10^0$	$7,00 \times 10^0$
H1	9,3	$3,05 \times 10^4$	0	$2,20 \times 10^1$	$2,50 \times 10^0$
H4	21,0	$3,40 \times 10^4$	$2,50 \times 10^1$	$4,00 \times 10^0$	$1,50 \times 10^0$
H5	23,1	$3,45 \times 10^4$	$4,50 \times 10^1$	$2,75 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$
I1	12,0	$5,15 \times 10^4$	$7,00 \times 10^1$	$2,35 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$
I4	27,6	$1,00 \times 10^4$	$1,50 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$	$1,00 \times 10^0$
I5	37,3	$3,15 \times 10^4$	$3,50 \times 10^1$	$2,50 \times 10^0$	$1,50 \times 10^0$

Tabela IV. 3. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (1, 2 e 3) da produção 3 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.

Amostras	Horas desde o início de produção	FAM (UFC/mL)	FAT (UFC/mL)	EATM (UFC/mL)	EATT (UFC/mL)
C	0,0	$1,00 \times 10^6$	$3,01 \times 10^3$	$4,50 \times 10^0$	$3,50 \times 10^0$
D	0,0	$1,00 \times 10^6$	$3,01 \times 10^3$	$4,50 \times 10^0$	$3,50 \times 10^0$
E	3,5	$1,49 \times 10^6$	$1,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-1}$
F	4,9	$2,80 \times 10^4$	$3,50 \times 10^3$	0	0
G1	4,9	$2,80 \times 10^4$	$3,50 \times 10^3$	0	0
G2	6,5	$2,35 \times 10^4$	$7,70 \times 10^3$	$2,00 \times 10^0$	$6,50 \times 10^0$
G3	16,0	$3,15 \times 10^4$	$6,65 \times 10^3$	0	$7,50 \times 10^0$
H1	7,2	$1,80 \times 10^4$	$5,00 \times 10^0$	$4,90 \times 10^1$	$8,50 \times 10^0$
H2	8,9	$2,55 \times 10^4$	$8,00 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$	$1,05 \times 10^1$
H3	18,3	$2,40 \times 10^4$	$7,00 \times 10^1$	$2,40 \times 10^1$	$1,60 \times 10^1$
I1	11,6	$1,15 \times 10^4$	$5,50 \times 10^1$	$1,75 \times 10^1$	$3,00 \times 10^0$
I2	15,2	$2,15 \times 10^4$	$2,30 \times 10^2$	$1,15 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$
I3	22,2	$1,55 \times 10^4$	$7,50 \times 10^1$	$2,40 \times 10^1$	$2,50 \times 10^0$

Tabela IV. 4. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (3 e 6) da produção 4 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.

Amostras	Horas desde o início de produção	FAM (UFC/mL)	FAT (UFC/mL)	EATM (UFC/mL)	EATT (UFC/mL)
C	0,0	$1,96 \times 10^6$	$1,33 \times 10^4$	0	$5,00 \times 10^{-1}$
D	5,0	$3,83 \times 10^6$	$1,33 \times 10^4$	0	0
E	7,5	$2,30 \times 10^5$	$5,63 \times 10^1$	$1,51 \times 10^2$	$2,25 \times 10^0$
F	11,0	$4,00 \times 10^3$	$6,50 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$	$1,50 \times 10^0$
G3	16,5	$4,50 \times 10^3$	$8,00 \times 10^2$	0	$1,00 \times 10^0$
G6	18,7	$6,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$	$1,00 \times 10^0$
H3	34,8	$2,50 \times 10^3$	$5,00 \times 10^1$	$1,10 \times 10^1$	0
H6	28,8	$2,40 \times 10^4$	$9,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^2$	$3,50 \times 10^0$
I3	35,1	$1,00 \times 10^4$	$1,50 \times 10^1$	$3,00 \times 10^0$	$5,00 \times 10^{-1}$
I6	0,0	$2,40 \times 10^4$	$9,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^2$	$3,50 \times 10^0$

Tabela IV. 5. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (1,2 e 5) da produção 5 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.

Amostras	Horas desde o início de produção	FAM (UFC/mL)	FAT (UFC/mL)	EATM (UFC/mL)	EATT (UFC/mL)
C	0,0	$3,60 \times 10^6$	0	0	0
D	0,0	$3,60 \times 10^6$	0	0	0
E	1,4	$1,17 \times 10^6$	$7,00 \times 10^1$	$2,50 \times 10^0$	$5,00 \times 10^{-1}$
F	6,2	$6,50 \times 10^3$	$1,30 \times 10^3$	0	$1,50 \times 10^0$
G1	6,2	$6,50 \times 10^3$	$1,30 \times 10^3$	0	$1,50 \times 10^0$
G2	7,8	$4,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{-1}$	$4,00 \times 10^0$
G5	14,4	$5,00 \times 10^3$	$3,50 \times 10^2$	0	$5,00 \times 10^{-1}$
H1	8,6	$8,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$	$8,50 \times 10^0$
H2	10,3	$1,50 \times 10^3$	$4,00 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$	$1,00 \times 10^1$
H5	16,9	$1,00 \times 10^3$	$2,50 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$	$1,10 \times 10^1$
I1	10,0	$8,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$	$8,50 \times 10^0$
I2	11,8	$1,50 \times 10^3$	$4,00 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$	$1,00 \times 10^1$
I5	19,2	$4,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^1$	$1,50 \times 10^0$	$5,50 \times 10^0$

Tabela IV. 6. Tabela representativa dos tempos de duração da produção entre a etapa C e as diversas amostras (em horas), para os vários lotes (4, 5 e 6) da produção 6 e as respetivas UFC/mL para cada grupo microbiano.

Amostras	Horas desde o início de produção	FAM (UFC/mL)	FAT (UFC/mL)	EATM (UFC/mL)	EATT (UFC/mL)
C	0,0	$1,25 \times 10^5$	$2,57 \times 10^3$	0	$1,00 \times 10^0$
D	0,0	$1,25 \times 10^5$	$2,57 \times 10^3$	0	$1,00 \times 10^0$
E	1,4	$1,20 \times 10^5$	$1,00 \times 10^2$	$3,01 \times 10^2$	$5,65 \times 10^1$
F	3,7	$6,00 \times 10^3$	$5,90 \times 10^3$	$5,00 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-1}$
G4	9,7	$1,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	0	$1,50 \times 10^0$
G5	13,4	$6,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^1$	0	0
G6	18,5	$2,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^1$	$5,00 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-1}$
H4	11,9	$3,50 \times 10^3$	$1,00 \times 10^1$	$2,05 \times 10^1$	0
H5	15,7	$7,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	0
H6	21,0	$1,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^1$	$6,50 \times 10^0$	0
I4	22,0	$2,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^0$	$5,50 \times 10^0$
I5	17,7	$6,40 \times 10^3$	$3,50 \times 10^1$	$3,00 \times 10^2$	$1,50 \times 10^0$
I6	25,6	$2,60 \times 10^3$	$5,50 \times 10^1$	$4,90 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$