

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



**APLICAÇÃO DE INFUSÕES DE ERVAS AROMÁTICAS PARA SUBSTITUIÇÃO DE
ADITIVOS QUÍMICOS NUM MODELO DE CARNE FERMENTADO**

ANA DE ALMEIDA RÉ

ORIENTADORA:
Doutora Maria João dos
Ramos Fraqueza

2020

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



**APLICAÇÃO DE INFUSÕES DE ERVAS AROMÁTICAS PARA SUBSTITUIÇÃO DE
ADITIVOS QUÍMICOS NUM MODELO DE CARNE FERMENTADO**

ANA DE ALMEIDA RÉ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor António Salvador
Ferreira Heriques Barreto

VOGAIS:

Doutora Maria João dos
Ramos Fraqueza
Doutora Marília Catarina
Leal Fazeres Ferreira

ORIENTADORA:

Doutora Maria João dos
Ramos Fraqueza

2020

“Na natureza, nada se cria, nada se perde, tudo se transforma”

Dedicatória

À minha mãe
Ao meu pai



Este trabalho foi subsidiado pelo Programa de Desenvolvimento Rural 2014-2020 , Portugal 2020 e Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural através do projeto Safe Meat Products “Segurança & Qualidade dos Produtos Cárneos Transformados” (PDR2020-1.0.1-FEADER-031359)



DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Ana de Almeida Ré

Título da Tese ou Dissertação: Aplicação de infusões de ervas aromáticas para substituição de aditivos químicos num modelo de carne fermentado

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2020

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 30 de junho de 2020

(indicar aqui a data da realização das provas

públicas)

Assinatura: _____

Ana Ré

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria João Fraqueza pela orientação, disponibilidade, competência e acima de tudo pela amizade, carinho e extrema paciência para as minhas mil e uma dúvidas existenciais. Obrigada por todos os ensinamentos, motivação e “raspanetes” que me guiaram neste caminho da forma que só nós sabemos, com muita alegria e gargalhadas à mistura.

À equipa técnica do Laboratório de Tecnologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, pela disponibilidade, ajuda, companheirismo e convívios. Às minhas R... de laboratório, obrigada por estes meses de luta, “Corage”, desorientações e trabalho. Em especial à Engenheira Maria José (Zezinha) por me ensinar tanto todos os dias, pelas danças, gargalhadas, cantorias e por estar sempre disponível para me ajudar no que fosse preciso e à Maria Helena na microbiologia (Leninha), pelas nossas “conversas” sagradas lá fora, pela alegria no trabalho e por tudo o que me ensinou neste percurso.

Aos professores da Faculdade Medicina Veterinária pelos conhecimentos transmitidos ao longo destes anos, em especial à Prof. Marília Ferreira pela força, conselhos e simpatia, ao Prof. Dr. José Pedro Lemos por estar sempre pronto para uma boa conversa sempre com alegria e por me apelidar como “menina dos chás” e ao Prof. Dr. António Barreto pela força, simpatia e sustos pregados sempre que “magicamente” aparecia no laboratório.

Um especial obrigado à equipa da secretaria que ao longo destes anos me ajudou imenso, com papeladas e afins, sempre com boa disposição e muitas gargalhadas à mistura, sem vocês a minha vida académica seria bem mais difícil.

Agradeço aos meus pais por todo o apoio e amor incondicional, por acreditarem em mim e pela extrema paciência que sempre tiveram comigo, sem vocês nada disto seria possível.

A todos os meus amigos (novos e antigos) pelo companheirismo, pela ajuda, pela confiança e pelo apoio. Em especial à Margarida Paz que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e “stressantes”.

Ao Gonçalo Nascimento por acreditar sempre em mim e apoiar-me. Mesmo estando longe estive sempre presente.

Ao Programa de Desenvolvimento Rural 2014-2020 , Portugal 2020 e Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural por subsidiar este trabalho através do projeto Safe Meat Products “Segurança & Qualidade dos Produtos Cárneos Transformados” (PDR2020-1.0.1-FEADER-031359).

Um Muito Obrigada a todos pois, sem vocês teria sido impossível concluir este sonho de criança. Veterinária és linda!

Aplicação de infusões de ervas aromáticas para substituição de aditivos químicos num modelo de carne fermentado

Resumo

Atualmente, existe uma procura crescente por conservantes naturais, sobretudo de origem vegetal, para reduzir o conteúdo de nitrito e/ou nitrato (aditivos químicos) em produtos curados à base de carne. Com este trabalho pretendeu-se estudar formas de substituir o uso destes aditivos químicos por infusões de quatro ervas aromáticas (Manjeriçã Rubra, Tomilho Limão, Orégãos vulgar e Sálvia Ananás), como fonte natural de nitrato, avaliando a evolução da microbiota tecnológica, características físico-químicas e sensoriais (baseado numa escala *Just about right*), num modelo cárneo armazenado em refrigeração durante quatro dias. Foram realizadas seis formulações, com diferentes concentrações de nitrato de sódio (mg) por quilograma de produto cárneo, correspondentes a: (C) Controlo com 0 ppm; (T1) Manjeriçã rubra com 70 ppm; (T2) Tomilho limão com 70 ppm; (T3) Manjeriçã rubra com 100 ppm; (T4) Sálvia ananás com 100 ppm; (T5) Orégãos com 100 ppm. Os modelos cárneos foram analisados realizando-se contagens de Aeróbios totais a 30 °C, *Enterobacteriaceae*, Bactérias Ácido Lácticas (BAL) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). Foram ainda determinados os teores de nitratos, nitritos, cloretos, a cor e o pH.

As infusões com sálvia ananás mostraram ter um maior conteúdo de nitrato (63.124 mg/100ml) em comparação com infusões de tomilho limão e orégãos. O modelo cárneo T4 apresentou uma maior quantidade de nitratos (média 16.91 mg/kg). Este produto modelo após um período de 2 para 4 dias de armazenamento a 4 °C, apresentou valores de nitrito de 3.93 mg/kg, onde se observou que a cor após cozedura teve um aumento da coordenada a* no dia 4, demonstrando uma cor mais rosada/avermelhada, indicativo do desenvolvimento do nitrosohemocromogénio. Além disso na caracterização sensorial do produto modelo não se notou nenhum aroma a ervas ou especiarias, exibindo sabores e cheiros neutros. Estes resultados indicam que os ingredientes naturais, como a infusão de sálvia ananás, podem ser possivelmente utilizados como alternativa a aditivos químicos na cura tradicional. Contudo, é necessária mais investigação para avaliar o impacto sensorial e microbiológico deste ingrediente quando utilizado em produtos curados à base de carne com novas formulações e com a adição de novos condimentos.

Palavras-chave: Nitrito, nitrato, ervas aromáticas, conservantes naturais, modelo cárneo.

Application of aromatic plants infusions to replace chemical additives in a fermented meat model

Abstract

Currently, there is an increasing demand for natural preservatives, mainly of vegetable origin, to reduce the content of nitrite and/or nitrate (chemical additives) in cured meat products. This work aimed to study ways to replace the use of these chemical additives by infusions of four aromatic plants (Red Basil, Lemon Thyme, Common Oregano and Pineapple Sage), as a natural source of nitrate, evaluating the evolution of technological microbiota, physical-chemical and sensory characteristics (based on a *Just about right* scale), in a meat model stored in refrigeration for four days. Six formulations were performed, with different concentrations of sodium nitrate (mg) per kilogram of meat product, corresponding to (C) 0 ppm control; (T1) 70 ppm red basil; (T2) 70 ppm lemon thyme; (T3) 100 ppm red basil; (T4) 100 ppm pineapple sage; (T5) 100 ppm common oregano. The meat models were analysed by performing total Aerobic counts at 30 °C, *Enterobacteriaceae*, Lactic Acid Bacteria (BAL) and *Staphylococcus* coagulase negative (SCN). The levels of nitrates, nitrites, chlorides, colour and pH were also determined.

Pineapple Sage infusions showed a higher nitrate content (63,124 mg/100ml) compared to lemon thyme and common oregano infusions. The T4 meat model showed a higher nitrate content (mean 16.91 mg/kg). This model product after a period of 2 to 4 days of storage at 4 °C, showed nitrite values of 3.93 mg/kg, where it was observed that the colour after cooking had an increase of the a* coordinate on day 4, showing a pinker/redder colour, indicative of the development of nitrosohemochromogen. In addition, the sensory characterization of the model product did not show any herbs or spices aroma, presenting neutral flavours and smells. These results indicate that natural ingredients, such as pineapple sage infusion, can possibly be used as an alternative to chemical additives in traditional curing. However, further research is needed to assess the sensory and microbiological impact of this ingredient when used in cured meat products with new formulations and the addition of new condiments.

Key words: Nitrite, nitrate, aromatic plants, natural preservatives, meat model.

Índice Geral

Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice Geral	v
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
Índice de Gráficos.....	xii
Índice de Abreviaturas	xiii
Índice de Símbolos	xiv
Introdução.....	1
I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Produtos cárneos curados e a sua tecnologia.....	3
1.1. Definição de produtos cárneos curados/fermentados	3
1.2. Classificação dos Produtos cárneos curados/fermentados	4
1.3. Processo de fabrico de enchidos curados/fermentados.....	4
1.3.1. Matérias-primas	4
1.3.2. Condimentos e especiarias.....	5
1.3.3. Aditivos alimentares	6
1.3.4. Invólucros	7
1.3.5. Fases de elaboração de enchidos fermentados	8
1.3.6. Microbiologia nos produtos fermentados.....	9
2. A cura dos enchidos fermentados e secos.....	10
2.1. Cura convencional.....	11
2.1.1. Definição cura	11
2.1.1.1. Atividade antimicrobiana.....	11
2.1.1.2. Manifestação do <i>flavour</i> “curado”	12
2.1.1.3. Atividade antioxidante	12

2.1.1.4	Formação de cor avermelhada.....	13
2.2.	Química dos agentes de cura.....	14
2.2.1.	Nitrato	14
2.2.2.	Nitrito	15
3.	Potenciais perigos nos produtos cárneos.....	16
3.1	Definição de perigo	16
3.2.	Perigos.....	17
3.2.1.	Perigos biológicos.....	19
3.2.2.	Perigos físicos	19
3.2.3.	Perigos químicos	20
4.	Impacto dos enchidos fermentados/curados na saúde do homem.....	20
4.1.	Formação endógena NOCs.....	21
5.	Estratégias de controlo de perigos.....	22
5.1.	Controlo de perigos químicos nos produtos cárneos transformados.....	24
6.	Alternativas aos processos tradicionais de cura.....	25
6.1	Alternativas baseadas no uso de plantas	26
6.2.	Problemas face ao uso de plantas e outros extratos naturais.....	27
6.3.	Fatores que influenciam o teor de nitratos nas plantas.....	27
6.3.1.	Definição de vegetais.....	27
6.3.2.	Nitrato nas plantas	27
6.3.3.	Fatores que influenciam a concentração de nitratos	28
6.3.3.1.	Fatores ambientais.....	28
6.3.3.1.1.	Tipo de solo	28
6.3.3.1.2.	Intensidade da luz e atividade do nitrato redutase endógena.....	29
6.3.3.2.	Fatores agrícolas.....	29
6.3.3.2.1.	Fertilizantes	29
6.3.3.2.2.	Estação do ano e região geográfica.....	30
6.3.3.2.3	Condições de armazenamento da colheita	30
6.4.	Caracterização das ervas aromáticas.....	30

II - Trabalho experimental: Aplicação de infusões de ervas aromáticas para substituição de aditivos químicos num modelo de carne fermentado	32
1. Objetivos e justificação	32
2. Material e Métodos	32
2.1. Produção das ervas aromáticas	32
2.1.1 Ervas aromáticas	32
2.1.2. Secagem das ervas aromáticas	33
2.2. Preparação de infusões das ervas aromáticas	34
2.3. Aplicação de infusões de ervas aromáticas num produto cárneo modelo	35
2.3.1. Desenho experimental	35
2.3.2. Fabrico do produto	36
2.4. Análises microbiológicas	39
2.4.1. Preparação da amostra	39
2.4.2 Contagem de Aeróbios totais a 30 °C	40
2.4.3. Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	40
2.4.4. Contagem de Bactérias Ácido Lácticas (BAL)	40
2.4.5. Contagem de bactérias <i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	41
2.5. Análises físico-químicas	41
2.5.1. Preparação da amostra	41
2.5.2. Determinação do teor de nitratos	42
2.5.3. Determinação do teor de nitritos	42
2.5.4. Determinação do teor dos cloretos	43
2.5.5. Determinação do pH	43
2.5.6. Determinação da Cor	43
2.6. Análise sensorial	44
2.6.1. Preparação e condições técnicas de apresentação da amostra para a realização da análise sensorial	44
2.6.2. Grupos focais	46
2.7. Análise estatística	47
3. Resultados e discussão	47

3.1. Caracterização das infusões de ervas aromáticas.....	47
3.2. Avaliação da aplicação de infusões de ervas aromáticas num modelo de um produto cárneo.....	50
3.2.1. Características microbiológicas das várias formulações de produtos cárneos modelos	50
3.2.2. Caracterização físico-química dos produtos cárneos modelo.....	54
3.2.3. Caracterização sensorial dos produtos cárneos modelo	64
4. Conclusões e considerações finais	67
Referências bibliográficas	70
Anexo 1 - Média e desvio padrão dos resultados obtidos para a contagem de aeróbios totais a 30 °C ao longo do tempo nos modelos cárneos	82
Anexo 2 - Média e desvio padrão dos resultados obtidos para a contagem de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) ao longo do tempo nos modelos cárneos	83
.....	

Índice de Figuras

Figura 1: Diagramas de fluxo de produtos à base de carne curados a seco, preparados a partir de carne picada/cortada (A) ou fabricados a partir de peças de carne de suíno / bovino (B). Adaptado de Fraqueza et al. (2020).	9
Figura 2: Reações do nitrito e do NO na mioglobina com mudanças que ocorrem no pigmento muscular da carne. Adaptado de Parthasarathy and Bryan (2012) e Taormina (2014).....	13
Figura 3: Terreno onde foram produzidas as espécies em experimentação no âmbito do projeto; A - Manjericão rubra; B - Sálvia ananás; C – Orégãos; D - Tomilho limão.	33
Figura 4: Termo higrómetro portátil e Secador artesanal de ervas aromáticas, CERCICA.....	33
Figura 5: A- Picadora elétrica Flama; B- Balança com resolução de 0,001g, <i>Sartorius analytic</i>	34
Figura 6: Preparação de infusões de ervas aromáticas; agitador magnético mantido a 80 °C e filtração com adição de carvão ativado da erva aromática manjericão rubra.	35
Figura 7: Fabrico do produto; A- Aparas de carne de suíno; B- Picagem das aparas de carne;	36
Figura 8: Infusões, previamente geladas, para incorporação nos modelos cárneos .	37
Figura 9: Fluxograma do desenho experimental do produto cárneo modelo.	38
Figura 10: Caixas de Petri com unidades formadoras de colónias (UFC) correspondentes a contagens de 1- Aeróbios totais a 30 °C (AT); 2 - <i>Enterobacteriaceae</i> (Enter); 3 - Bactérias Ácido Lácticas (BAL) e 4 - <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> (SCN).	39
Figura 11: Stomacher Lab – Blender 400.....	39
Figura 12: Bancada de trabalho; Caixas de Petri inoculadas para contagem de 1- Aeróbios totais a 30 °C; 2- <i>Enterobacteriaceae</i> ; 3- Bactérias Ácido Lácticas e 4- <i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	40
Figura 13: Apresentação dos modelos cárneos do dia 0, antes da cozedura e método de cozedura dos modelos cárneos.	41
Figura 14: A- Coluna de cádmio; B- Espectrofotómetro, <i>Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000</i>	42
Figura 15: Potenciómetro digital portátil.....	43
Figura 16: Colorímetro Minolta CR-300.....	44
Figura 17: Local onde decorreu a prova sensorial (Laboratório de Tecnologia dos Produtos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária); Amostras dos modelos cárneos, cortadas em segmentos com cerca de 2 cm.	45
Figura 18: Ficha da prova sensorial.....	45

Figura 19: Contagem de Aeróbios totais a 30 °C, ao longo do tempo.	51
Figura 20: Contagem de bactérias ácido lácticas, ao longo do tempo.....	53
Figura 21: Aparência da cor dos produtos com diferentes formulações ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C dos modelos cárneos crus.....	58
Figura 22: Aparência da cor dos produtos com diferentes formulações ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, após cozedura.....	62

Índice de Tabelas

Tabela 1: Lista de possíveis perigos biológicos, químicos e físicos, em produtos fermentados, relacionados com os materiais recebidos e as etapas de processamento. Adaptado Fraqueza and Barreto (2015)	17
Tabela 2: Lista de possíveis perigos biológicos, químicos e físicos, em produtos fermentados, relacionados com as etapas de processamento. Adaptado Fraqueza and Barreto (2015).....	18
Tabela 3: Medidas preventivas para controlar potenciais perigos identificados na produção de produtos fermentados. Adaptado Fraqueza and Barreto (2015)	25
Tabela 4: Formulações dos modelos cárneos.....	36
Tabela 5: Composição dos grupos focais.	46
Tabela 6: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para o parâmetro nitratos (mg/100ml) para as infusões de ervas aromáticas	47
Tabela 7: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para o parâmetro nitritos (mg/100ml) para as infusões de ervas aromáticas	49
Tabela 8: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para a contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> ao longo do tempo nos modelos cárneos.....	51
Tabela 9: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para a contagem de SCN ao longo do tempo nos modelos cárneos	53
Tabela 10: Média e desvio padrão dos resultados obtidos no dia 0 para o parâmetro cloretos (%) nos modelos cárneos.....	54
Tabela 11: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para o parâmetro pH ao longo do tempo nos modelos cárneos	55
Tabela 12: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para a conteúdo de nitratos (mg/kg) e nitritos (mg/kg) ao longo do tempo nos modelos cárneos.....	55
Tabela 13: Média dos resultados obtidos para o parâmetro cor para os vários tratamentos de modelos cárneos crus.....	57
Tabela 14: Média dos resultados obtidos para os parâmetros de cor nos modelos cárneos de várias formulações cozidos.....	61
Tabela 15: Valores médios da avaliação hedônica e análise de penalidades determinadas pela avaliação não ideal para os atributos analisados nas seis formulações de modelos cárneos.....	66

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Distribuição (%) das categorias da escala JAR COR para os seis modelos cárneos estudados; (1 – muito fraco, 2 – fraco, 3 Ideal, 4 – forte, 5 – muito forte).....64

Gráfico 2: Distribuição (%) das categorias da escala JAR CHEIRO para os seis modelos cárneos estudados; (1 – muito fraco, 2 – fraco, 3 Ideal, 4 – forte, 5 – muito forte). 65

Índice de Abreviaturas

- ASC - Ascorbato de Sódio
a_w - Atividade da água
BAL - Bactérias Ácido Lácticas
BHA - Hidroxianisol Butilado
BPH - Boas Práticas de Higiene
BPF - Boas Práticas de Fabrico
CE - Comunidade Europeia
CERCICA - Cooperativa para a Educação e Reabilitação de Cidadãos Inadaptados de Cascais
DFD - *Dark, Firm, Dry* / Dura, Firme e Seca
EFSA – European Food Safety Authority / Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
GRAS - *Generally Recognized as Safe* / Geralmente reconhecido como seguro
HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Points* / Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos
HAP's - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* / Cromatografia líquida de alta eficiência ou alta performance
HPP - *High Pressure Processing* / Alta pressão hidrostática
HR% - Humidade Relativa
IARC – *International Agency for Research on Cancer* / Agência Internacional de investigação sobre o cancro
ISO - *International Organization for Standardisation* / Organização Internacional de Normalização
JAR - *Just About Right*
L.D. - Limite de Detecção
NOCs - Compostos N-nitrosos
NP - Norma Portuguesa
NR - Enzima Nitrato Redutase
OMS - Organização Mundial de Saúde
PCC - Ponto Crítico de Controlo
pH - Potencial hidrogeniónico
pO₂ - Pressão Parcial de Oxigénio
ppm - Partes Por Milhão (em massa como mg/kg ou mg/litro)
PSE - *Pale, Soft, Exudative* / Pálida, Macia e Exsudativa
Starter - Cultura de arranque
SNC - *Staphylococcus* Coagulase Negativa
UE - União Europeia
UFC - Unidade Formadora de Colónias

Índice de Símbolos

% - Percentagem

> - maior que

< - menor que

≥ - maior ou igual a

≤ - menor ou igual a

± - mais ou menos

°C - Grau Celsius

cm - Centímetros

g - Grama

h - Hora

ha - Hectare

kg - Quilograma

m² - Metro quadrado

min. - Minuto

ml - Mililitro

mg - Miligrama

n^o - Número

n - Número de ensaios

Introdução

A carne e os produtos à base de carne são a principal fonte de proteínas em dietas omnívoras. São também alimentos ricos noutros nutrientes, entre os quais vitaminas (B6 e B12) e minerais (zinco e ferro) (McNeill and Van Elswyk 2012; Fraqueza et al. 2018). A carne apresenta uma elevada atividade de água, $a_w = 0.99$, um elevado pH (5.8-6.0) e uma grande disponibilidade de nutrientes, o que a torna bastante sensível à contaminação e deterioração microbiológica necessitando assim de cuidados especiais de conservação. Consequentemente, a fermentação e a cura consideram-se processos importantes de conservação da carne dando origem a produtos cárneos seguros e salubres, devido ao decréscimo de pH, causado pela produção de ácido láctico relacionado com a multiplicação de bactérias ácido lácticas (BAL) e pela redução simultânea do a_w , causada pela adição de sais de cura e pela secagem.

Os produtos à base de carne fermentados são comumente definidos como produtos transformados de carne que resultam do corte da carne e gordura misturados com agentes de cura (nitritos e/ou nitratos), sal, especiarias, açúcar e outros aditivos. Esta massa cárnea é introduzida em invólucros naturais ou artificiais (tripas) e posteriormente os produtos são submetidos a um processo de fermentação (com principal envolvimento de BAL), associado a secagem e fumagem.

A adição de conservantes tais como nitrato e/ou nitrito (agentes de cura) à carne permite o desenvolvimento de uma cor típica avermelhada, desenvolvimento do *flavour* a curado, redução da oxidação lipídica, atividade antimicrobiana, principalmente relacionada à inibição da multiplicação de *Clostridium botulinum* e extensão do prazo de validade dos produtos à base de carne, contribuindo para a segurança microbiológica destes produtos (Honikel 2014).

No entanto, existem potenciais perigos associados à utilização incorreta (quantidade em excesso) destes sais de cura, como a potencial formação de nitrosaminas, substâncias carcinogénicas, que resultam da combinação do nitrito com aminas e amidas secundárias, reação promovida por um ambiente ácido. Esta quantidade em excesso de nitrito e/ou nitrato, a preparação culinária pelos consumidores ou a etapa de digestão gástrica são pontos críticos para o aumento da probabilidade de formação de nitrosaminas no Homem (Walker 1990; Rywotycki 2007; Sindelar and Milkowski 2012; Honikel 2014; Oostindjer et al. 2014; Taormina 2014; Reig and Toldrá 2015; Riel et al. 2017; IARC 2018). Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) apresentou um relatório da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), comunicando que os produtos cárneos processados aumentam o risco de cancro do cólon, devido à presença de compostos nitrosados, portanto, os produtos cárneos processados foram classificadas no grupo de risco I (cancerígeno para humanos) (IARC

2018). Neste contexto, o uso de nitrato e/ou nitrito é regulamentado na indústria de alimentos, mediante os regulamentos (CE) nº 1333/2008 e (CE) nº 231/2012.

Atualmente os consumidores desenvolveram uma visão negativa em relação aos aditivos químicos preferindo alimentos naturais, que não recorram à adição excessiva de conservantes dessa natureza e que mantenham uma aparência muito semelhante aos produtos cárneos curados tradicionalmente (Alahakoon et al. 2015; Majou and Christieans 2018; Sebranek et al. 2012). Esta preferência levou à investigação e ao interesse da indústria de carne em encontrar alternativas que respondam à procura do consumidor, através do uso de conservantes naturais, à base de plantas, com o objetivo de reduzir o uso de aditivos e reduzir o conteúdo de nitrito e/ou nitrato em produtos cárneos.

As alternativas propostas incluem o uso de infusões de ervas aromáticas, como fonte natural de nitratos, no entanto, estas estratégias que podem parecer mais naturais para os consumidores envolvem a adição indireta de nitrato/nitrito ao produto cárneo não resolvendo a raiz do problema (Sebranek and Bacus 2007; Fraqueza et al. 2018). No momento presente, ainda não foi encontrado nenhum composto que desempenhe todas as funções dos nitritos, há que desenvolver estratégias para reduzir compostos com potencial carcinogénico (nitrosaminas) garantindo simultaneamente a segurança biológica e qualidade sensorial dos produtos cárneos fermentados/curados, e minimizando-se a visão negativa do consumidor em relação a estes produtos.

A primeira parte deste trabalho corresponde a uma revisão bibliográfica composta por 6 capítulos, com o objetivo de fornecer informação sobre os produtos cárneos curados/fermentados descrevendo o seu processo de fabrico, classificando-os e caracterizando a matéria-prima, condimentos, aditivos, invólucros e técnicas usadas no seu fabrico (cura convencional). Identificaram-se os perigos biológicos, físicos e químicos associados a estes produtos com possíveis estratégias no seu controlo. Apresentaram-se os possíveis impactos na saúde do homem causados pelo consumo dos enchidos curados/fermentados. Consideram-se como alternativas ao uso de aditivos químicos (nitratos/nitritos) o uso de plantas aromáticas, com caracterização das ervas aromáticas aplicadas neste trabalho.

Na segunda parte, definiram-se os objetivos do trabalho e descreveram-se todos os materiais e métodos utilizados. Os desenvolvimentos das formulações dos modelos cárneos aparecem descritos no segundo capítulo deste trabalho, bem como as metodologias analíticas microbiológicas, físico-químicas e sensoriais realizadas aos produtos. Procedeu-se à análise estatística dos resultados obtidos e sua apresentação com discussão através de comparações realizadas com outros autores que trabalharam em ensaios semelhantes. Finalmente, conclui-se sobre a análise crítica dos resultados que foi efetuada.

I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Produtos cárneos curados e a sua tecnologia

1.1. Definição de produtos cárneos curados/fermentados

O Decreto-Lei nº 207 de 23 de outubro de 2008 define “Carnes e seus produtos” dividindo-os em carnes frescas, os preparados de carne e os produtos à base de carne. Os preparados de carne são a “carne fresca, incluindo carne que tenha sido reduzida a fragmentos, a que foram adicionados outros géneros alimentícios, condimentos ou aditivos ou que foi submetida a um processamento insuficiente para alterar a estrutura das suas fibras musculares e eliminar assim as características de carne fresca”.

Os produtos à base de carne são definidos como os “produtos resultantes da transformação da carne ou da ulterior transformação desses mesmos produtos, de tal modo que a superfície de corte à vista, permite verificar o desaparecimento das características da carne fresca”. O mesmo decreto define ainda os produtos de origem animal transformados, como sendo “os produtos derivados de animais, bem como produtos provenientes destes, destinados ao consumo humano, associados ou não a outros géneros alimentícios, e que foram sujeitos a um tratamento por aquecimento, fumagem, cura, maturação, secagem, marinagem, extração, extrusão ou uma combinação destes processos”

Os produtos à base de carne curados e fermentados podem ser definidos como produtos de carne picada, misturada com sal e outros agentes de cura, especiarias, açúcar e outros aditivos, que são enchidos em invólucros naturais ou artificiais (tripas) e submetidos a um processo de fermentação com origem em microrganismos, associado a secagem ou fumagem. A ação de microrganismos específicos (principalmente BAL), estafilococos ou enzimas endógenas da carne (matéria prima), resulta em propriedades únicas e distintas da carne como o desenvolvimento de sabor (*flavour*), cor e garantia da segurança microbiológica (Rovira et al. 2015; Skandamis and Nychas 2015).

No geral, os produtos fermentados são considerados alimentos seguros e estáveis devido ao decréscimo de pH, resultando numa baixa acidez biológica, causada pela produção de ácido láctico relacionado com a multiplicação de BAL e pela redução simultânea da atividade da água (a_w), causada pela adição de sais de cura e secagem (Champomier-Vergès and Zagorec 2015; Fraqueza and Barreto 2015; Ockerman and Basu 2015; Rovira et al 2015; Toldrá and Hui 2015). O decréscimo de pH e redução simultânea de a_w são fatores importantes no controlo da multiplicação de microrganismos patogénicos sendo a razão pela qual, estes produtos cárneos fermentados, tem uma longa história de uso e são tão populares (Bourdichon et al. 2012; Champomier-Vergès and Zagorec 2015; Skandamis and Nychas 2015).

1.2. Classificação dos Produtos cárneos curados/fermentados

Ao longo do tempo, os produtos à base de carne têm sido classificados de maneiras distintas, consoante o país ou a região onde são produzidos. Estas classificações são baseadas em diferentes propriedades como: o a_w , o pH, o conteúdo proteico, a humidade, o rácio humidade/proteína e a perda de peso, dando origem a produtos à base de carne com texturas e aromas característicos (Hansen 2002; Talon et al. 2008).

Os produtos à base de carne são classificados em enchidos curados/fermentados tendo como característica principal a utilização de tripas como invólucros, associados a fases de fermentação acompanhadas por secagem e fumagem ou não; podem ainda ser peças inteiras submetidas à ação do sal, adicionado a seco ou em salmoura, colocadas num invólucro, associadas a secagem e a fumagem ou não (por exemplo o salpicão ou paio do lombo) (Ockerman and Basu 2015; Skandamis and Nychas 2015).

Os parâmetros a_w e pH são de grande importância para a conservação dos alimentos conseguindo-se estabelecer duas categorias quanto à sua estabilidade microbiológica. Os enchidos “curados secos” são produtos com a_w de $\leq 0,90$ e $\text{pH} \leq 5,2$, são microbiologicamente estáveis e não necessitam de refrigeração. Os enchidos com “humidade intermédia” são produtos com a_w de 0,95 a 0,91 ou pH de 4.5 a 5.2, são alteráveis e devem ser armazenados abaixo de 10 °C (Skandamis and Nychas 2015).

1.3. Processo de fabrico de enchidos curados/fermentados

O processo de fabrico passou a ser maioritariamente industrial nos últimos anos, embora existam ainda pequenas unidades de fabrico tradicional, com produtos muito apreciados pelo consumidor (Talon and Leroy 2006). Nos enchidos fermentados, o processo de fabrico, compreende o corte da carne fresca e da gordura e sua mistura e tempero com os condimentos, especiarias e aditivos, seguindo-se o enchimento em tripas, um período de fermentação e o processo de secagem e/ou fumagem.

1.3.1. Matérias-primas

As principais matérias-primas dos enchidos são a carne (essencialmente de suíno) e a gordura e as suas características físico químicas e microbiológicas são determinantes para a qualidade e segurança do produto final, logo é essencial que haja uma seleção criteriosa da carne (Gomes 2017).

O Regulamento 853/2004 de 29 de abril define carne como “as partes comestíveis dos animais ungulados domésticos, aves de capoeira, lagomorfos, caça selvagem e caça miúda e grossa selvagem incluindo o sangue”. Regra geral, a carne de animais adultos tem vantagens devido ao seu alto conteúdo em mioglobina, o que contribui para uma cor mais

intensa (Lucke 1998). Além da boa capacidade de retenção de água e a firmeza da carne, a determinação do pH para a produção de enchidos fermentados de qualidade é fundamental pois demonstra que as condições de abate e transporte foram respeitadas. Valores ideais de pH estão entre 5,5 e 5,8, com o propósito de eliminar carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*) (com pH inferior a 5,2, com cor pálida e capacidade de retenção de água diminuída) e carnes DFD (*Dark, Firm, Dry*) (com valores de pH superiores a 6,2, com capacidade de retenção de água aumentada, com cor escura e tempo de vida útil reduzida) (Maganhini et al. 2007).

A relação músculo/gordura é importante, porque a quantidade da gordura afeta a qualidade do produto final, conferindo ao produto suculência, tenrura, sabor, mantém a humidade facilitando a atuação dos microrganismos responsáveis pela fermentação que ocorre durante a cura. Portanto, a carne selecionada deve ser equilibrada em termos da composição de carne magra e gordura (Marcos et al. 2016).

As bactérias que aparecem em predominância na carne fresca são tipicamente Gram-negativas aeróbicas psicrótróficas, pseudomonas, enterobacterias, um pequeno número de BAL e outras bactérias Gram-positivas. As BAL e outras bactérias Gram-positivas tornam-se a microflora dominante em anaerobiose, ambiente incentivado pelo processo de fermentação (Ockerman and Basu 2015).

A água também é uma matéria-prima e tem como objetivo dissolver e facilitar a difusão dos condimentos, especiarias e aditivos, permitindo uma melhor homogeneização das massas cárneas (Ruiz and Pérez-Palacios 2015).

1.3.2. Condimentos e especiarias

Os condimentos e especiarias são ingredientes facultativos que desempenham funções cruciais, ao conferirem características organolépticas e ao contribuírem para a conservação do produto final. Não são considerados aditivos alimentares pois a sua utilização tem como objetivo conceder determinado aroma e/ou sabor como referido nos termos do Regulamento (CE) nº 1333/2008.

As especiarias são definidas como substâncias aromáticas de origem vegetal, utilizadas para fornecer sabores e aromas, não oferecendo nenhum valor nutricional aos produtos. São bastante úteis para prevenir a oxidação das gorduras (antioxidante), além de estimular a multiplicação de BAL (Ockerman and Basu 2015). Apresentam propriedades antimicrobianas, prevenindo a multiplicação de bactérias patogénicas e deteriorantes (Incze 1998). Os condimentos mais utilizados na elaboração de enchidos são o sal, o alho ou a massa de alho e a massa de pimentão (contribuindo para uma coloração alaranjada do produto cárneo), conferindo características organolépticas desejáveis e típicas destes produtos além de inibirem a multiplicação de microrganismos patogénicos e deteriorantes (Zhang et al. 2016).

O sal (NaCl - Cloreto de sódio), sendo o ingrediente mais comum, desempenha funções gustativas (realça o sabor), inibe a multiplicação microbiana através da redução do a_w do produto, facilita a solubilidade das proteínas e reduz a atividade de algumas enzimas oxidativas (Ruiz and Pérez-Palacios 2015). É adicionado entre 1 e 2%, o que permite por um lado a multiplicação das BAL e por outro a inibição de vários microrganismos indesejados (Ockerman and Basu 2015).

Existem vários ingredientes que podem ser introduzidos nestes produtos, dependendo do tipo de enchido, região e costume de cada fabricante, tais como: canela, cravinho, mostarda, pimenta, louro, coentros, orégãos, sálvia, tomilho, cebola, vinagre ou vinho, salsa, cominhos, noz-moscada, entre outros. Alguns deles, por terem uma forte ação aromática e saborizante são aplicados em quantidades muito pequenas.

1.3.3. Aditivos alimentares

Segundo o Regulamento (CE) nº 1333/2008 “os aditivos alimentares são substâncias que não são consumidas habitualmente como géneros alimentícios em si mesmas, mas que são intencionalmente adicionadas aos géneros alimentícios para atingir determinado objetivo tecnológico, como por exemplo, a conservação dos géneros alimentícios”.

Os aditivos alimentares utilizados, aprovados e enumerados nos anexos II e III do Regulamento (CE) nº 1333/2008, têm de obedecer aos critérios estabelecidos no Regulamento (CE) nº 231/2012 que define especificações para estes aditivos. Apenas os aditivos alimentares que estão incluídos na lista da União constante do anexo II do Regulamento (CE) nº 1333/2008 podem ser colocados no mercado e utilizados nos géneros alimentícios nas condições de utilização aí especificadas. Contudo, o Regulamento (UE) nº 1129/2011 modifica o anexo II do Regulamento (CE) nº 1333/2008 na parte E do anexo II, onde estão explicitados os aditivos alimentares autorizados e as suas condições de utilização em todas as categorias de géneros alimentícios, estando atribuída uma categoria à carne e seus produtos.

A utilização dos aditivos alimentares deve ter como objetivo uma necessidade tecnológica, deve ser segura e não deve induzir em erro o consumidor nem ser desvantajosa para este. Os fabricantes usam os aditivos por vários motivos tais como, facilitar/acelerar ou padronizar os processos de fabrico, aumentando o rendimento do produto, garantir a segurança do produto ao inibir por exemplo a multiplicação microbiana e a formação de toxinas microbianas, evitar a presença de bolores indesejáveis de superfície e atribuir características sensoriais do produto (Roncalés 2015).

Os aditivos alimentares são divididos em 24 categorias, sendo os mais comuns na elaboração de enchidos, os conservantes, substâncias que prolongam a durabilidade dos géneros alimentícios protegendo-os contra a deterioração causada por microrganismos (os

nitratos e os nitritos de sódio e de potássio, também são utilizados para estabilização da cor), os antioxidantes, substâncias que prolongam a durabilidade dos géneros alimentícios, protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação, tal como a rancidez das gorduras e as alterações de cor, os reguladores da maturação, os potenciadores de sabor, os emulsionantes que garantem uma mistura homogénea entre água e gorduras os reguladores do pH (ácido láctico, ácido cítrico) e os corantes (cochinilha, carotenóides, xantófilas) (Bleotu et al. 2018).

Apenas dois grupos de conservantes são considerados para uso, os que inibem especificamente esporos de bactérias anaeróbias produtoras de toxinas e os que inibem fungos e leveduras de superfície (Roncalés 2015).

Do primeiro grupo, os nitritos, E249 - nitrito de potássio (KNO_2) e E250 - nitrito de sódio ($NaNO_2$), têm sido utilizados tradicionalmente para curar carne sendo conservantes necessários nos produtos à base de carne a fim de controlar eventuais multiplicações de bactérias nocivas, como o *Clostridium botulinum* (Ockerman and Basu 2015). Além disso, são aditivos essenciais para o desenvolvimento da cor e sabor da carne curada (Roncalés 2015). Os nitratos, E251 - nitrato de sódio ($NaNO_3$) e E252 - nitrato de potássio (KNO_3), e os nitritos são frequentemente utilizados em combinação, mas geralmente o nitrato não é necessário, exceto como reservatório de nitrito, que pode ser benéfico nos processos de cura a longo prazo (Ockerman and Basu 2015). Os nitratos devem ser adicionados em concentrações mais altas pois a sua ação é retardada durante a cura, enquanto que os nitritos devem ser adicionados em concentrações mais baixas e o seu efeito é alcançado mais cedo (Roncalés 2015). De acordo com Decreto-Lei nº 33 de 25 de fevereiro de 2008, a quantidade legalmente autorizada para o fabrico de produtos cárneos não tratados termicamente é de 150 mg/kg de nitrito de potássio ou nitrito de sódio adicionado e de 300 mg/kg de nitrato de potássio adicionado (Decreto-Lei 33/2008).

1.3.4. Invólucros

As tripas são utilizadas como invólucros proporcionando à massa de carne coesão, forma e dimensão, protegendo de influências externas e eventuais contaminações microbiológicas o interior das massas cárneas (Elias et al. 2006). As tripas utilizadas na produção de enchidos, podem ser naturais ou artificiais. É muito importante uma adequada seleção das tripas para a obtenção de um produto de qualidade. Um dos critérios mais importantes da tripa é a sua elasticidade pois permite a sua expansão durante o enchimento e retração durante a secagem. Outro critério de escolha importante é a sua resistência à pressão produzida durante o enchimento (Heinz and Hautzinger 2007). O enchimento mecânico torna a etapa de enchimento mais rápida, com menos manipulação do operador e reduz a possibilidade de ocorrência de bolsas de ar, responsáveis por defeitos de fabrico

(desenvolvimento microbiano, oxidação lipídica, aromas e colorações desagradáveis) (Patarata et al. 1998; Lücke 2015).

As tripas de origem animal provêm do intestino delgado e grosso dos animais (Elias and Baixinho 2007; Ockerman and Basu 2015) e por serem um produto alterável devem ser conservadas em sal, em refrigeração, a temperaturas entre os 2 °C e os 4 °C, congeladas ou desidratadas. Como principais características têm permeabilidade aos componentes do fumo e um aspeto *suigeneris*, tornando estas tripas as preferidas dos produtos tradicionais. Contudo, apresentam uma reduzida resistência mecânica originando produtos com um calibre irregular impróprio para os processos de fabrico à escala industrial. São inúmeros os fatores que influenciam a qualidade das tripas naturais, tais como a saúde do animal, espécie, idade e raça, bem como o tipo de alimentação, o processo de abate e a porção do trato intestinal que se pretende usar (Wu et. al 2015).

As tripas artificiais são produzidas a partir de colagénio (Elias and Baixinho 2007; Ockerman and Basu 2015) e ao contrário das tripas naturais estão mais adaptadas aos processos industriais permitindo um maior rendimento, facilidade de manipulação e maior uniformidade do calibre. A contaminação microbiológica das tripas artificiais é praticamente inexistente não precisando de elevados cuidados de armazenamento (Pecanac et al. 2015).

1.3.5. Fases de elaboração de enchidos fermentados

O fabrico dos enchidos fermentados secos ou de humidade intermédia compreende operações de corte, mistura da gordura e da carne triturada, com inúmeras combinações de temperos (vinho, alho, pimenta, pimentão), especiarias, aromas, sal, açúcar, aditivos como os conservantes (nitrito/nitrato), a que se segue um período de repouso (maturação). A maturação reúne reações físicas, químicas e microbiológicas onde ocorrem mudanças significativas tais como, decréscimo do pH, desenvolvimento da população microbiana, redução do nitrato em nitritos, formação de nitrosomioglobina, solubilização e gelificação de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, fenómenos proteolíticos, lipolíticos, oxidativos e desidratação (Casaburi et al. 2007).

No final da maturação, a massa cárnea maturada é introduzida em tripas com auxílio de uma enchedora manual ou mecânica. Logo após o enchimento os produtos são submetidos a um processo de cura onde continuam as reações iniciadas na fase de maturação conferindo ao produto características organolépticas características (Casaburi et al. 2007). Após a fermentação por BAL, o produto pode sofrer fumagem e/ou secagem sob condições controladas de temperatura e HR% (Skandamis and Nychas 2015).

As formulações dos enchidos fermentados são numerosas, mesmo para produtos com o mesmo nome. O tempo, a temperatura, a HR% e a fumagem controlam a qualidade do produto final e a combinação destas últimas três são bastante variáveis na produção industrial

(Ockerman and Basu 2015). Existem algumas diferenças de processo em produtos fabricados a partir de peças de carne de suíno ou bovino ou preparados a partir de carne picada ou cortada, como se resume na Figura 1.

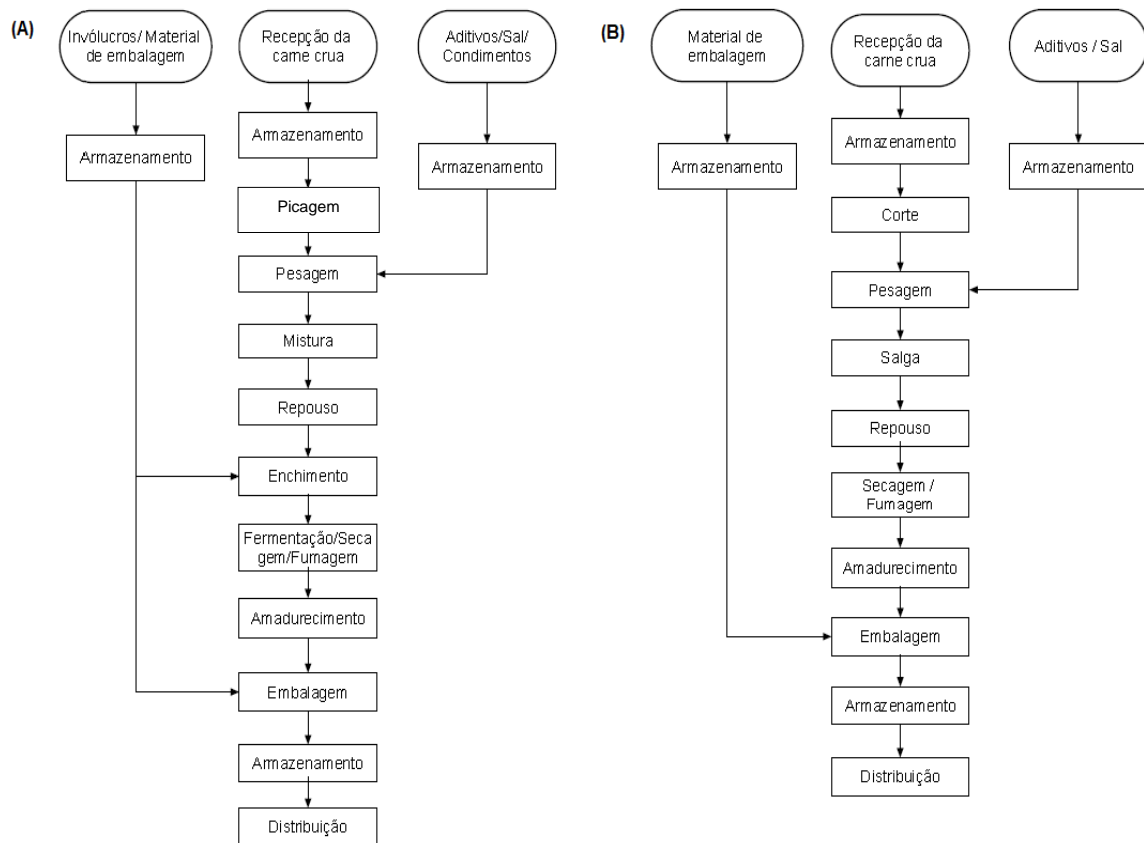


Figura 1: Diagramas de fluxo de produtos à base de carne curados a seco, preparados a partir de carne picada/cortada (A) ou fabricados a partir de peças de carne de suíno / bovino (B). Adaptado de Fraqueza et al. (2020).

1.3.6. Microbiologia nos produtos fermentados

Nos enchidos fermentados os microrganismos existentes derivam da matéria-prima, das formulações, da higiene do equipamento/ambiente fabril e dos manipuladores durante o processo de fabrico, sendo responsáveis pelo sabor e textura do produto final (Cherroud et al. 2014).

Hoje em dia a fermentação dos enchidos é principalmente realizada por um grupo de bactérias: bactérias ácido lácticas (BAL), onde estão incluídas como exemplo as espécies *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*. Os *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN), especialmente *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus* (Champomier-Vergès and Zagorec 2015; Ockerman and Basu 2015), não sendo fermentadores, têm um papel fundamental durante a cura dos

enchidos que não deve ser desprezado. Sendo assim, a fermentação e a maturação de enchidos tradicionais dependem da microflora inicial presente no produto cárneo tais como, as BAL e os SCN, tornando-os ligeiramente ácidos, sendo responsáveis pelas suas características sensoriais e conservação

Os enchidos fermentados/secos estão associados a boas práticas de higiene (BPH), uma vez que as bactérias responsáveis pela fermentação funcionam como um obstáculo à multiplicação de microrganismos de deterioração garantindo a segurança dos produtos (Bedin 2014; Champomier-Vergès and Zagorec 2015).

Contudo esta microbiota natural pode ser insuficiente para que a fermentação ocorra naturalmente resultando num produto final sem as características organoléticas desejáveis. Atualmente, a utilização de culturas de arranque (*Starter*) é um fator importante na indústria da carne para produzir um produto mais uniforme e estável, resultando num produto final com melhor qualidade, assegurando a reprodutibilidade e resultando em características organoléticas desejáveis (Ojha et al. 2015).

2. A cura dos enchidos fermentados e secos

A cura, como processo de conservação dos produtos cárneos, remonta às civilizações primitivas e equivale à adição de sal comum à carne crua de suíno, bovino, aves ou peixes (Parthasarathy and Bryan 2012; Taormina 2014). A história da cura está perdida na antiguidade, mas acredita-se que esta prática tenha tido origem em 3000 a.C. (Sindelar and Milkowski 2011; Taormina 2014).

Nos tempos antigos, o sal era obtido a partir de depósitos cristalinos deixados pela evaporação de lagoas/tanques de água salgada, água do mar ou mineração diretamente da terra. Como consequência, estes sais continham outros contaminantes naturais, como nitrato de sódio ou potássio ou nitrito, que contribuíam diretamente para a reação de cura e o processo de conservação, embora ainda não fosse reconhecida a sua existência na época (Pegg and Shahidi 2000; Parthasarathy and Bryan 2012). Por volta de 200 a.C., os romanos reconheceram que algumas fontes de sal, contaminadas com salitre (KNO_3), contribuíam para uma cor avermelhada das carnes curadas (Pegg and Shahidi 2000; Taormina 2014; Bedale et al. 2016).

Embora não esteja claro quando é que o salitre foi reconhecido pela primeira vez como agente de cura, é claro que o nitrato ou o salitre como contaminante do cloreto de sódio, foi usado para curar carne durante muitos séculos antes de cientistas começarem a desvendar o mistério da química da cura de carne (Sebranek and Bacus 2007). Uma vez reconhecido o salitre como fonte de geração da cor da carne curada, tornou-se comum a adição direta de nitrato às misturas de carne. Em meados do século XIX, a indústria da carne começou a evoluir desenvolvendo-se a transformação e a conservação dos produtos cárneos, sendo o

salitre reconhecido como contaminante do sal (Honikel 2008; Sebranek 2009). No final de 1800, descobriu-se que o nitrato era convertido em nitrito por bactérias redutoras de nitrato e demonstrou-se que o nitrito é o composto responsável pela cor e *flavour* das carnes curadas (Sebranek and Bacus 2007; Bedale et al. 2016).

2.1. Cura convencional

2.1.1. Definição cura

A cura é um processo de conservação da carne, pelo qual agentes de cura e adjuvantes são adicionados à carne, com ou sem fumagem, secagem e cozimento, com a capacidade de conferirem propriedades distintas de cor e *flavour* (Taormina 2014). A cura da carne significa a adição de nitrito e/ou nitrato juntamente com NaCl, tendo este a capacidade de reduzir o a_w evitando a sua deterioração e degradação microbiana (Romans et al. 2001; Honikel 2008; Parthasarathy and Bryan 2012; Taormina 2014).

No entanto, a eficácia da cura depende de vários fatores, tais como pH, temperatura, concentrações de nitrato ou nitrito, presença de aceleradores de cura como o NaCl ou o ascorbato e o eritorbato, estado de óxido redução do ferro, teor de ferro e teor microbiano inicial da carne (Majou and Christieans 2018).

Os nitritos e nitratos são conhecidos como conservantes da carne e produtos de carne. O nitrito contribui para a segurança microbiológica, a cor típica da cura avermelhada, o desenvolvimento do *flavour* e a extensão do prazo de validade dos produtos à base de carne (Honikel 2014).

Assim, acredita-se que os agentes de cura tenham quatro efeitos em função das concentrações permitidas: (1) Atividade antimicrobiana (sob forma de ácido nitroso (HNO_2) ou óxido nítrico (NO)); (2); Manifestação do *flavour* “curado” (3) Atividade antioxidante; (4) Formação de cor avermelhada.

2.1.1.1. Atividade antimicrobiana

Uma das principais razões para o uso de nitrato e nitrito é a sua ação conservante. Estes aditivos desempenham um papel fundamental na carne curada como um agente bacteriostático e bactericida (Sebranek and Bacus 2007; Gassara et al. 2016).

O nitrito impede a multiplicação de alguns microrganismos patogénicos aeróbios e anaeróbios, principalmente o *Clostridium botulinum* e suprime, especialmente, a proliferação de esporos de *Clostridium botulinum*, funcionando como agente anti botulínico (Hustad et al. 1973; Sebranek and Bacus 2007; Sebranek 2009; Sindelar and Milkowski 2011; Parthasarathy and Bryan 2012; Honikel 2014; Alahakoon et al. 2015; Gassara et al. 2016). O nitrito também atrasa a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, embora não a iniba totalmente (Sebranek

and Bacus 2007; Xi et al. 2011). Foi relatado que este contribui para controlar também a multiplicação de vários outros microrganismos patogênicos, como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. (Parthasarathy and Bryan 2012).

O nitrito geralmente é considerado mais eficaz contra bactérias Gram-positivas do que bactérias Gram-negativas (Taormina 2014).

2.1.1.2. Manifestação do *flavour* “curado”

A manifestação do *flavour* “curado” é o aspeto menos compreendido da química do nitrito na carne curada. Embora seja relativamente fácil distinguir o *flavour* do presunto curado, a identidade química do *flavour* “curado” permanece desconhecida (Sindelar and Milkowski 2011). Foi sugerido que a diferença de *flavour* observada na carne curada pode ser devida à supressão da oxidação lipídica pelo nitrito (Binkerd and Kolari 1975; Honikel 2014). Embora o nitrito seja um antioxidante altamente eficaz, outros antioxidantes não produzem *flavour* típico de carne curada (Sebranek 2009).

2.1.1.3. Atividade antioxidante

Outra propriedade notável do nitrito é a sua capacidade de atrasar o aparecimento de ranço durante o armazenamento e os subsequentes odores e sabores desenvolvidos após o aquecimento da carne e dos produtos à base de carne (Pegg and Shahidi 2000; Parthasarathy and Bryan 2012).

As seqüências de reação do nitrito que originam o radical monovalente do ácido nitroso (NO) para a formação da cor provavelmente também desempenham um papel importante na forte função antioxidante do nitrito na carne curada, que serve para proteger o *flavour* do produto e evitar o ranço (Sebranek 2009). Essa relação entre reações de cor e função antioxidante é provável porque os mecanismos propostos para o efeito antioxidante do nitrito incluem reações com proteínas, heme e iões metálicos, atividade quelante radical por NO e formação de compostos nitrosos e nitrosil com propriedades antioxidantes (Pegg and Shahidi 2000).

O NO tem propriedades antioxidantes, pela sua capacidade de agir como um recetor de radicais livres (Sato and Herring 1973). No entanto, a ação antioxidante primária do NO está na sua capacidade de se ligar e estabilizar o ferro heme dos pigmentos da carne, diminuindo a quantidade de ferro livre libertado durante a fase de cozimento da carne (Alahakoon et al. 2015). O ferro livre é um potente catalisador da oxidação lipídica (Parthasarathy and Bryan 2012).

2.1.1.4 Formação de cor avermelhada

Na carne, existem pelo menos três formas de mioglobina (Mb): uma oxigenada chamada oximioglobina ($MbFe^{2+}O_2$) de cor vermelha brilhante, uma oxidada chamada metamioglobina ($MbFe^{3+}$) de cor castanha e uma forma reduzida, chamada desoximioglobina ($MbFe^{2+}$) (Majou and Christieans 2018) (Figura 2).

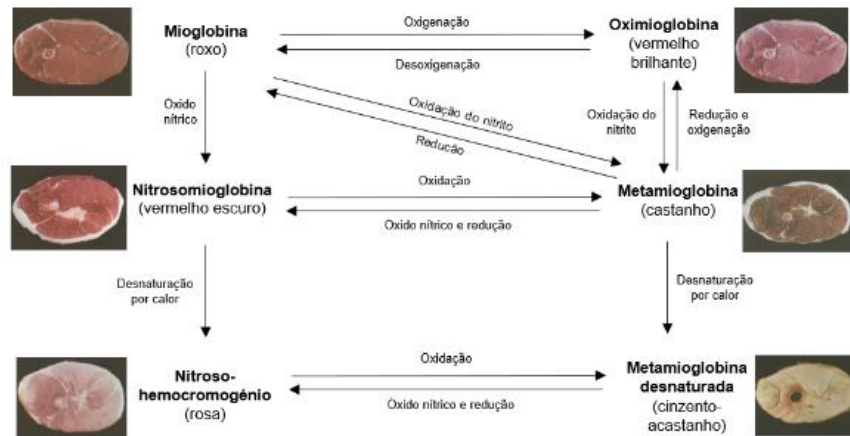
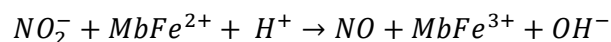


Figura 2: Reações do nitrito e do NO na mioglobina com mudanças que ocorrem no pigmento muscular da carne. Adaptado de Parthasarathy and Bryan (2012) e Taormina (2014).

A pressão parcial de oxigênio (pO_2) é um fator importante na existência dessas três moléculas (Møller and Skibsted 2006), ou seja, a oximioglobina é a forma predominante quando há predominância de oxigênio no ambiente (Honikel 2008). Em condições anaeróbicas e ácidas, o oxigênio deixa o heme e permite que o nitrito reaja com $MbFe^{2+}$ para formar NO e $MbFe^{3+}$ como indicado na equação seguinte (Shiva et al. 2007):



Esta reação é realizada em concorrência com a auto-oxidação de $MbFe^{2+}O_2$, que é o resultado da catálise ácida no pH da carne. A conversão de $MbFe^{2+}O_2$ ou $MbFe^{2+}$ em $MbFe^{3+}$ é espontânea.

A cor característica dos produtos cárneos curados é devida à concentração de pigmentos heme (mioglobina e hemoglobina) e dos seus estados químicos (Parthasarathy and Bryan 2012). A cor atraente e o *flavour* desenvolvido como resultado da cura e do fumo tornaram os produtos cárneos curados populares entre os consumidores (Taormina 2014). Além das questões de segurança já referidas, o nitrito é absolutamente essencial para a qualidade do produto cárneo. A redução do nitrito a NO e a sua reação com a mioglobina dá origem à característica cor curada rosa avermelhada (Parthasarathy and Bryan 2012).

Quando se usa nitrato este necessita de ser reduzido em nitrito (NO_2^-), depois em NO, que reage com o ferro da molécula do pigmento heme, originando a nitrosomioglobina de cor avermelhada (em produtos refrigerados) ou o nitrosohemocromogênio de cor rosada (em

produtos curados cozidos ou secos) estes formam a base para o *flavour* e a cor da carne curada (Haldane 1901; Møller and Skibsted 2002; Olivo et al. 2018) (Figura 2).

Com o tratamento térmico, a cor é estabilizada pela desnaturação da mioglobina, resultando na formação do pigmento hemocromogénio de cor rosada. No processamento da maioria dos produtos cárneos curados a seco, a redução de tamanho da carne leva à incorporação de ar (oxigenação dos tecidos) logo, a oximioglobina (de cor vermelha brilhante) será predominante no momento de adição de agentes de cura. Quando adicionamos nitritos, a carne fica instantaneamente com uma cor acastanhada, pois, a presença de nitrito contribui para que a mioglobina e a oximioglobina da carne sejam oxidadas a metamioglobina de cor acastanhada (Sebranek 2009). Tal como se pode observar na equação seguinte: $NO_2^- + \text{mioglobina} - Fe^{2+}(\text{oximioglobina}) \rightarrow \text{mioglobina} - Fe^{3+}(\text{metamioglobina}) + NO + OH^-$

Observando a equação anterior, existe uma rápida transformação visual da cor da carne que auxilia a confirmação da presença de nitrito nos produtos cárneos curados, pois se o nitrito não estivesse presente, a carne não formaria a cor acastanhada, mantendo a cor avermelhada da mioglobina (Sebranek 2009).

Quando o NO, formado na reação anterior, se combina com a metamioglobina, forma-se um pigmento intermédio instável denominado de nitrosilmetamioglobina. O pigmento nitrosilmetamioglobina sofre redução (desoximioglobina), dando origem à nitrosomioglobina (NOMb) responsável pelo pigmento vermelho brilhante dos produtos cárneos curados antes do tratamento térmico (Pegg and Shahidi 2000). Esta redução pode ser realizada na carne naturalmente, sendo um processo mais lento ou por agentes redutores adicionados na mistura de cura.

2.2. Química dos agentes de cura

2.2.1. Nitrato (NO_3^-)

O NO_3^- , por si só não tem potencial de cura direta, ou seja, não é capaz de conferir efeitos funcionais. Em produtos cárneos é usado especificamente em certas condições de cura em que o nitrito deve ser produzido no produto por longos períodos de tempo, durante a secagem ou armazenamento. Ou seja, o NO_3^- serve como fonte/reservatório para manter uma concentração efetiva de NO_2^- , pois este é muito reativo como agente de cura e é rapidamente esgotado nas carnes curadas (Sebranek 2009; Honikel 2014; Majou and Christieans 2018; Olivo et al. 2018). Para que ocorra a conversão do NO_3^- em NO_2^- reativo é necessário um passo adicional que é tipicamente realizada por microrganismos sendo necessário tempo/temperatura adequados para a conversão microbiana (Binkerd and Kolari 1975; Sebranek and Bacus 2007; Sebranek 2009). Isso pode ser conseguido pela microflora bacteriana naturalmente encontrada na carne ou pela adição de microrganismos, como

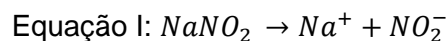
culturas *Starter*, com propriedades redutoras de NO_3^- (Heaselgrave et al. 2010). Os microrganismos que expressam a enzima nitrato redutase (NR) sob condições anaeróbicas, incluem *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus* (Talon et al. 1999), *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. lentus*, *S. simulans*, *Bacillus subtilis* (Burke and Lascelles 1975), Kocuria, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, estirpes de *Leuconostoc*, entre outras. Nas bactérias, o NO_3^- é usado como substrato para respiração anaeróbica.

2.2.2. Nitrito (NO_2^-)

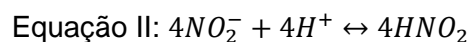
As reações químicas do NO_2^- na cura da carne são bastante complexas envolvendo uma ampla gama de reagentes e produtos finais diferentes. As reações de NO_2^- são fonte das propriedades únicas e distintas que caracterizam os produtos à base de carne curada e, por esse motivo, o NO_2^- é o verdadeiro agente de cura da carne (Sebranek 2009; Honikel 2014).

O KNO_2 ou NaNO_2 é um composto cristalino amarelo pálido, quase branco, altamente solúvel em água. A aparência do NaNO_2 puro é muito semelhante ao sal, açúcar e pode ser facilmente confundida com outros ingredientes alimentares comumente usados. Como o NO_2^- é uma substância tóxica, o uso incorreto tem consequências potencialmente graves (Sebranek 2009).

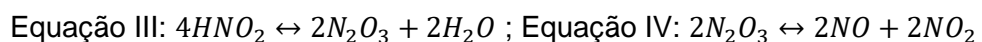
O NaNO_2 é adicionado à carne em conjunto com o sal. Os sais de NO_2^- dissociam-se quase completamente na água para produzir íons Na^+ e NO_2^- onde o anião nitrito (NO_2^-) por si só não está ativo como agente de cura (Equação I).



Numa peça de carne ou massa de carne, o valor do pH é de aproximadamente 5,5-6,0 e o NO_2^- e o NO_3^- são altamente solúveis em soluções aquosas (Parthasarathy and Bryan 2012; Honikel 2014). Neste ambiente levemente ácido, uma pequena proporção de aniões NO_2^- reagem com os íons H^+ para formar HNO_2 (Equação II) (Honikel 2014).



O HNO_2 está em equilíbrio com seu anidrido nitroso (N_2O_3) (Equação III) e posteriormente decompõe-se em $\text{NO} + \text{NO}_2$ (Dióxido de nitrogênio) (Equação IV).



O NO é o agente de cura eficaz que se liga à mioglobina. O NO reage com o ferro da mioglobina (Fe^{+2}) e metamioglobina (Fe^{+3}) para formar cores distintas (Figura 2) (Pegg and Shahidi 2000; Sebranek and Bacus 2007).

O NO formado a partir de N_2O_3 pode ligar-se à mioglobina (Fe^{+2}) e formar uma nitrosomioglobina estável ao calor (NO-mioglobina) como está representado na equação V. A oximioglobina não é estável ao calor e dissocia-se mais rapidamente (Gassara et al. 2016) (Figura 2).

Equação V: $NO + \text{Mioglobina} \rightarrow NO - \text{Mioglobina (cor avermelhada)}$

O NO_2 formado a partir de N_2O_3 , reage com a água para produzir $HNO_2 + HNO_3$ (ácido nítrico) (Equação VI).

Equação VI: $2NO_2 + H_2O \rightarrow HNO_3 + HNO_2$

O HNO_2 reinsere na sequência de eventos (Equação III). 1/3 do HNO_2 é oxidado em HNO_3 e 2/3 são reduzidos para NO (Equação VII).

Equação VII: $3HNO_2 \rightarrow 2NO + HNO_3 \text{ (oxidação; redução)} + H_2O$

O HNO_3 , como um ácido forte, é completamente dissociado em $H^+ + NO_3^-$ (Equação VIII). Assim, um resultado dessa sequência de reações, além do desenvolvimento da cor, é a formação de NO_3^- . Isso explica por que razão o NO_3^- é comumente encontrado em carnes curadas, mesmo quando não foi adicionado (Honikel 2008; Sebranek 2009). Sabe-se que 10-40% do NO_2^- é oxidado em NO_3^- durante o processo de cura (Honikel 2008).

Equação VIII: $HNO_3 \rightarrow H^+ + NO_3^-$

O tempo do processo de cura dos produtos cárneos pode ser diminuído utilizando agentes redutores, tais como, o ascorbato de sódio, ácido isoascórbico (eritorbato), pois aceleram a reação de cura ao reduzir a metamioglobina em desoximioglobina (estável). O nitrito e o ácido ascórbico reagem quimicamente entre si, havendo um aumento de produção de óxido nítrico, proporcionando uma quantidade superior à normalmente obtida do ácido nitroso. O ascorbato de sódio (ASC) auxilia a conversão de N_2O_3 , de forma mais rápida, promovendo a coloração típica rosada destes produtos, diminui ligeiramente o pH do meio, favorecendo o desenvolvimento da cor, ajuda a manter a mioglobina no estado reduzido (desoximioglobina) e previne a descoloração dos produtos cárneos curados na presença de luz e/ou oxigênio (Equação IX) (Sebranek 2009).

Equação IX: $N_2O_3 + 2 H^+ - ASC \rightarrow 2 NO + 2 \text{ de - hidro - ASC} + H_2O$

3. Potenciais perigos nos produtos cárneos

3.1 Definição de perigo

O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS 2004) define um perigo como uma propriedade inerente de um agente com potencial de causar efeitos adversos a uma população exposta, e sua avaliação está relacionada a um processo planejado, a fim de determinar a identificação, caracterização e possível efeito de um agente. Ou seja, um perigo é qualquer fator que pode estar presente num produto e pode causar prejuízo ao consumidor devido a uma lesão ou doença (Fraqueza and Barreto 2015; Meler et al. 2015).

3.2. Perigos

Os perigos nos produtos cárneos têm origens biológicas, químicas e físicas. A identificação de perigos em produtos cárneos deve considerar todos os ingredientes, materiais recebidos, as etapas do processo de fabricação do produto e contaminação ambiental, e deve basear-se em conhecimentos prévios, obtidos a partir de dados de pesquisas epidemiológicas e experimentais (Fraqueza and Barreto 2015; Fraqueza et al. 2018).

As Tabela 1 e Tabela 2, ilustram, resumidamente, uma lista de potenciais perigos biológicos, químicos e físicos, em produtos fermentados, relacionados com os materiais recebidos e as etapas do processamento.

Tabela 1: Lista de possíveis perigos biológicos, químicos e físicos, em produtos fermentados, relacionados com os materiais recebidos e as etapas de processamento. Adaptado Fraqueza and Barreto (2015)

	Biológicos (bactérias, parasitas, vírus)	Químicos	Físicos	
Materiais recebidos	Carne crua: suíno e bovino	Bactérias não esporuladas: <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Campylobacter</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> Bactérias esporuladas: <i>C. botulinum</i> , <i>C. perfringens</i> Parasitas: <i>Trichinella</i> , <i>Cysticercus cellulosae</i> , <i>C. bovis</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>	Antibióticos/resíduos de medicamentos, Hormonas, Pesticidas Aminas biogênicas de origem microbiana (tiramina e histamina)	Osso, plástico, madeira, partículas de metal
	Especiarias	<i>B. cereus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i>	Produto químico não alimentar, pesticidas, micotoxinas	Partículas de plástico, areia e madeira, pedras, metal
	Sal	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Vibrio</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridia</i>	Produto químico não alimentar	Metal, areia e partículas do solo, pedras
	Invólucros	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridia</i>		
	Água	Não potável, <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Vibrio</i> spp., <i>Clostridia</i> , <i>Cryptosporidium</i> , vírus	Produto químico não alimentar	

Tabela 2: Lista de possíveis perigos biológicos, químicos e físicos, em produtos fermentados, relacionados com as etapas de processamento. Adaptado Fraqueza and Barreto (2015)

	Biológicos (bactérias, parasitas, vírus)	Químicos	Físicos	
Etapas de processamento	Receção	Receção de material não conforme com os requisitos legais ou predefinidos. Multiplicação de microrganismos patogénicos na carne fresca devido a tempo/temperatura inadequados	Material de embalagem impróprio para alimentos ou rotulagem incorreta	Receção de material não conforme com os requisitos legais ou predefinidos
	Armazenamento	Multiplicação de microrganismos patogénicos na carne devido a tempo/temperatura inadequados, Contaminação bacteriana de especiarias durante o armazenamento, multiplicação de fungos, produtores de micotoxinas devido ao aumento da humidade relativa		
	Cortes e aparas de carne de suíno	Contaminação e multiplicação de microrganismos patogénicos devido a tempo/temperatura inadequados		Partículas de ossos e metais que escapam durante o corte da carne
	Picagem	Contaminação e multiplicação de microrganismos patogénicos devido a tempo/temperatura inadequados	Resíduos de detergentes, desinfetantes e lubrificantes	Partículas de ossos e metais que escapam durante a picagem da carne
	Pesagem de ingredientes e aditivos		Excesso de nitritos / nitratos ou outros aditivos devido a erros de pesagem	
	Mistura	Multiplicação de microrganismos patogénicos devido a tempo/temperatura inadequados	Resíduos de detergentes, desinfetantes e lubrificantes	
	Enchimento	Contaminação com microrganismos patogénicos por más práticas de higiene	Resíduos de detergentes, desinfetantes e lubrificantes	Rebentamento do invólucro, partículas ósseas e de metais
	Repouso	Multiplicação de microrganismos patogénicos devido a tempo/temperatura inadequados		
	Fermentação/ Secagem/ Maturação	Multiplicação de microrganismos patogénicos devido a tempo/temperatura/humidade inadequados, fermentação inadequada, redução insuficiente de pH e a_w	Aminas biogénicas de origem microbiana (tiramina e histamina)	
	Fumagem	Multiplicação de microrganismos patogénicos devido a tempo/temperatura/humidade inadequados, fermentação inadequada, redução insuficiente de pH e a_w	Aminas biogénicas de origem microbiana (tiramina e histamina), Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP's), dioxinas	
	Embalagem/ rotulagem	Contaminação com microrganismos patogénicos pelo ambiente ou manuseamento durante a embalagem, multiplicação de microrganismos patogénicos por selagem ou concentração de gás inadequadas	Alergias a um ingrediente devido a rotulagem inadequada	
	Armazenamento do produto final	Multiplicação de fungos devido a tempo/temperatura/humidade inadequados	Micotoxinas	
	Distribuição	Contaminação com microrganismos patogénicos através de embalagens danificadas, multiplicação de microrganismos patogénicos devido a tempo/temperatura/humidade inadequados	Contaminação cruzada de resíduos químicos não alimentares através de embalagens danificadas	Partículas de plástico, madeira e metal

3.2.1. Perigos biológicos

Os contaminantes biológicos são provavelmente os perigos mais relevantes nos produtos cárneos. Considerando que apenas os animais saudáveis e produtores de carne são introduzidos na cadeia alimentar, após o abate, é frequente que a carne esteja associada a perigos biológicos, causadores de doenças de origem alimentar, tais como, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* VTEC, *Campylobacter* spp. *Yersinia enterocolítica*, *Mycobacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* e *C. perfringens*, *C. botulinum* e *Bacillus cereus*. Além disso, parasitas e vírus devem ser considerados e identificados na cadeia de produtos cárneos (Blagojevic and Antic 2014).

Os principais parasitas transmitidos pela carne incluem os protozoários *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* spp., os helmintos *Trichinella* spp. e *Taenia* spp., que podem ser transmitidas através do consumo de carne de suíno (Djurković-Djaković et al. 2013; Blagojevic and Antic 2014) e também *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* ou *intestinalis* (Bleotu et al. 2018).

Como principais viroses devemos considerar o vírus da hepatite E e A, o norovírus, o rotavírus, o enterovirus, adenovirus e o astrovírus, transmissíveis por alimentos que causam toxicoinfeção alimentar, através da ingestão de carne de suíno (Blagojevic and Antic, 2014; Bleotu et al. 2018; Machnowska et al. 2014).

3.2.2. Perigos físicos

Nesta categoria de perigos incluem-se objetos que podem estar presentes nas matérias-primas ou objetos que podem ser introduzidos nos produtos alimentares através da manipulação dos alimentos.

Os perigos físicos mais frequentes são materiais de natureza diversificada, tais como, vidros, madeiras, pedras, metais, materiais de isolamento ou de revestimento, ossos, plásticos e objetos de uso pessoal (Baptista et al. 2003). A frequência destes perigos, em produtos fermentados é desconhecida (Fraqueza and Barreto 2015), no entanto, apesar da sua baixa frequência, os fragmentos de ossos e metais devem ser abordados pois apresentam repercussões sociais, com perdas económicas para os produtores se estes perigos forem encontrados pelos consumidores em produtos fermentados (Fraqueza and Barreto 2015; Melero et al. 2015).

3.2.3. Perigos químicos

Os perigos químicos são substâncias que podem ocorrer naturalmente (associados diretamente às características das próprias matérias-primas) ou são introduzidas durante a produção/manuseamento dos alimentos, práticas agrícolas, processamento industrial, armazenamento inadequado e contaminação ambiental (Special report 2019).

Deste conjunto de perigos destacam-se os aditivos alimentares (por exemplo, nitritos e nitratos), e ainda os pesticidas/produtos agrícolas (inseticidas, rodenticidas, fungicidas, herbicidas), medicamentos veterinários (antibióticos), micotoxinas, toxinas naturais e marinhas, metais pesados (arsénico, cádmio, chumbo, mercúrio), alérgenos (glúten, lactose) e químicos criados (nitrosaminas, acrilamida) ou introduzidos no processo de fabrico (produtos de limpeza e desinfecção, lubrificantes) (Püssa 2013; Safefood 360° 2013; Fraqueza and Barreto 2015; Melero et al 2015; Reig and Toldrá 2015).

Como referido anteriormente no capítulo 1.3.3. sobre “Aditivos alimentares”, estes são utilizados na preparação, embalagem, transporte e armazenamento de alimentos, sendo adicionados aos alimentos para fins tecnológicos (conservação dos géneros alimentícios) (Bleotu et al. 2018; Maldonado-Simán et al. 2018). Contudo, são identificados como um potencial perigo pois quando a sua pesagem é incorreta a sua concentração pode ser excessiva (Fraqueza and Barreto 2015).

4. Impacto dos enchidos fermentados/curados na saúde do homem

O uso de nitrito para a cura da carne tornou-se uma grande preocupação na década de 1960, quando foi descoberto que o nitrito tem potencial para formar compostos N-nitrosos (nitrosaminas), substâncias carcinogénicas, que resultam da combinação do NO com aminas e amidas secundárias num ambiente adequado (sob condições gástricas ácidas e altas temperaturas) (Walker 1990; Correia et al. 2010; Mensinga et al. 2003; Honikel 2008; Honikel 2014; Taormina 2014; Kmecl and Znidarčič 2015; Bedale et al. 2016).

O envolvimento do nitrito na formação de compostos carcinogénicos, torna o consumo de carnes processadas motivo de controvérsia pois a presença de compostos N-nitrosos (NOCs) é um dos principais mecanismos envolvidos no aumento do risco de cancro devido ao consumo de carne processada (Corpet 2011; Fraqueza et al 2018).

As nitrosaminas mais frequentemente encontradas na carne processada são N nitrosodimetilamina (NDMA), N nitrosodietilamina (NDEA), N nitrosopiperidina (NPIP) e N nitrosopirrolidina (NPYR) (Reig and Toldrá 2015; IARC 2018).

O processo de produção de produtos à base de carne curados, a composição do produto (quantidade de nitrito e/ou nitrato adicionado e residual), a preparação culinária de alimentos (cozimento a alta temperatura >130 °C, através da fritura, grelha ou churrasco) ou

a etapa de digestão gástrica são fatores críticos para um aumento da probabilidade de formação de nitrosaminas no Homem (Walker 1990; Rywotycki 2007; Honikel 2008; Sindelar and Milkowski 2012; Honikel 2014; Oostindjer et al. 2014; Taormina 2014; Reig and Toldrá 2015; Riel et al. 2017; IARC 2018).

A principal preocupação em relação ao nitrato é a sua potencial conversão endógena em nitritos e nitrosaminas (Hammes 2012; Bahadoran et al. 2016). Estes produtos e os metabolitos da reação dos nitratos, incluindo nitrito, óxido nítrico e NOCs, têm potencialmente implicações adversas para a saúde associadas principalmente aos cancros gástricos, esofágicos, cerebrais, da bexiga, do colon rectal, pulmonares, prostáticos, mamários, hepáticos, do pâncreas e renais, algumas toxicidades agudas e crónicas, como a metahemoglobinémia (Mantovani et al. 2005; Santamaria 2006; EFSA 2008; Kmecl and Znidarčič 2015; Gassara et al. 2016; Sareer et al. 2016; Colla et al. 2018; Fraqueza et al. 2018; Olivo and Ribeiro 2018; Roila et al. 2018; Kyriacou et al. 2019).

A ligação entre cancro e produtos cárneos processados é discutida há décadas. Recentemente, um grupo de trabalho da Agência Internacional para Pesquisa do Cancro (IARC) sintetizou milhares de artigos de pesquisa e concluiu que a relação entre produtos à base de carne e cancro colon rectal era inquestionável, portanto, os produtos cárneos processados foram classificadas no grupo de risco I (cancerígeno para humanos) para esse tipo de cancro (IARC 2018). No entanto, a ingestão de nitrato ou nitrito (nitrosação endógena) e o consumo de carne vermelha foram classificados no grupo de risco IIA (provavelmente cancerígenos para humanos) (IARC 2010; IARC 2018).

O efeito mais amplamente reconhecido do excesso de nitrato na saúde é a metahemoglobinémia, conhecido como síndrome do bebé azul. Este síndrome leva à coloração azul da pele dos bebés devido às altas concentrações de nitrato no sangue. O efeito mais conhecido do nitrito é sua capacidade de reagir com a hemoglobina (oxyHb) (Santamaria 2006) para formar numa hemoglobina quimicamente alterada, metehemoglobina (metHb), que dificulta a entrega de O₂ aos tecidos (Mensinga et al. 2003; Bedale et al. 2016; Gassara et al. 2016). A condição foi observada principalmente em bebés com menos de 6 meses de idade e particularmente naqueles com menos de 3 meses de idade (IARC 2010).

4.1. Formação endógena NOCs

Em humanos, os NOCs são endogenamente formados, principalmente, após o consumo de carne vermelha ou processada (IARC 2018).

O nitrato entra predominantemente no corpo humano a partir de vegetais, água e outros alimentos, no entanto ele também é formado de forma limitada endogenamente (Lundberg et al. 2004; Lundberg et al. 2008). Enquanto a exposição humana ao nitrato é

principalmente exógena, a exposição ao nitrito é principalmente endógena via metabolismo do nitrato (EFSA 2008).

No corpo humano, a cavidade oral é o principal local de redução ($\pm 20\%$) de nitrato em nitrito (Lundberg et al. 2004; Lundberg et al. 2008; EFSA 2008), onde está presente uma microflora anaeróbica, estável e redutora de nitrato (Doel et al. 2004; EFSA 2008; IARC 2010; Bedale et al. 2016), constituída por, *Veillonella atypica*, *Vitellariopsis dispar* e *Actinomyces odontolyticus* (Doel et al. 2005), na superfície dorsal da língua (Butler 2015). Os adultos saudáveis têm normalmente uma conversão salivar de nitrato em nitrito entre 5 a 7% da ingestão total de nitrato (Spiegelhalder et al. 1976; Gangolli et al. 1994).

Após o transporte para o estômago, as condições ácidas convertem rapidamente o nitrito em ácido nitroso, que por sua vez se decompõe espontaneamente em óxidos de nitrogênio, incluindo óxido nítrico (EFSA 2008). No estômago, o nitrito reage com aminas e amidas secundárias, formando NOCs (Sindelar and Milkowski 2012). Pensa-se que a nitrosação gástrica é provocada pelo nitrito resultante da redução salivar do nitrato. Como a maioria da saliva é deglutida, cerca de 80% do nitrito gástrico no estômago é formado através da redução do nitrato ingerido ou endógeno. Os 20% restantes de nitrito gástrico resultam do nitrito ingerido em carnes, peixes e outros alimentos preservados com nitrito (IARC 2010).

5. Estratégias de controlo de perigos

Os alimentos destinados ao consumo humano, devem ser submetidos a regras de higiene/salubridade durante todas as etapas de produção, processamento, armazenamento, distribuição e preparação, com a finalidade de prevenir doenças provocadas por alimentos como infeções, intoxicações e alergias alimentares (Bleotu et al. 2018). O principal objetivo da segurança dos alimentos é de produzir e comercializar produtos alimentares saborosos, convenientes, seguros e de qualidade com o propósito de garantir aos consumidores confiança de que os alimentos que adquirem não lhes causarão danos nem terão efeitos adversos (Fraqueza and Barreto 2015; Lücke 2015; Toldrá et al. 2015).

A qualidade final de um produto cárneo fermentado depende de inúmeros fatores, incluindo a qualidade das matérias-primas, ingredientes/aditivos, as condições de processamento (fermentação/secagem), a embalagem e as condições de armazenamento na fábrica e durante a distribuição. Este controlo de qualidade é essencial para a padronização dos produtos cárneos fermentados (Toldrá et al. 2015).

A sanificação é fundamental para a segurança e qualidade dos alimentos sendo o ponto-chave para todos os programas de segurança dos alimentos pois produz produtos seguros, reduzindo a incidência de doenças transmitidas por alimentos, melhora o prazo de validade de um produto e previne a deterioração de equipamentos e instalações aumentando a eficiência da produção, reduzindo custos de energia e manutenção (Melero et al. 2015).

Assim, na indústria de alimentos, a sanificação aborda todas as medidas preventivas que podem ser tomadas para manter condições de higiene na produção, evitando a introdução de contaminantes (biológicos, químicos e físicos) nos alimentos, minimizando os perigos potenciais para os consumidores (Rovira et al., 2015). Este programa de sanificação deve ser implementado previamente à análise de perigos e identificação de pontos críticos de controlo (PCC) com base no HACCP em todas as etapas da produção (FAO/WHO 2009; Melero et al. 2015).

O sistema HACCP, reconhecido mundialmente como o método mais eficaz e menos dispendioso para garantir a segurança dos alimentos, integra todas as etapas de processamento e deve incluir a descrição do produto (formulações), informações de distribuição, a identificação dos produtos (crus ou cozidos), a construção de um fluxograma com uma breve descrição de todas as etapas operacionais envolvidas, desde a receção das matérias-primas até à distribuição do produto final e uma identificação e análise de potenciais perigos, em conjunto com os PCC necessários (Fraqueza and Barreto 2015). Todos os potenciais perigos devem ser identificados e considerados de acordo com os pré-requisitos e medidas preventivas implementadas com base no HACCP, onde vários fatores devem ser analisados e tomados em consideração para deliberar se o perigo está ou não presente no processamento de produtos de carnes (Fraqueza et al. 2018). Os PCC (ponto crítico de controlo) numa etapa ou procedimento, são essenciais para a segurança do produto nos quais o controlo de perigos é efetuado, eliminando ou reduzido esses perigos a níveis aceitáveis, no entanto, requerem monitorização rigorosa e cara (Fraqueza and Barreto 2015). Uma ação tomada num PCC é denominada como uma medida preventiva. Uma medida preventiva controla um perigo, real e de ocorrência provável, que possa ocorrer numa determinada etapa de processamento. Pode ser necessária mais do que uma medida preventiva para controlar um perigo ou mais de um perigo pode ser controlado por uma única medida preventiva (Fraqueza and Barreto 2015). Na Tabela 3 estão apresentadas algumas medidas preventivas para controlar potenciais perigos identificados na produção de produtos fermentados.

É importante que as fábricas implementem um sistema de boas práticas de higiene (BPH), para evitar a contaminação por parte dos trabalhadores e ambiente, e boas práticas de fabrico (BPF) (Fraqueza and Barreto 2015; Rovira et al. 2015), estas práticas podem garantir o controlo de alguns perigos, eliminando-os ou reduzindo-os.

A rastreabilidade das matérias-primas e de todos os ingredientes utilizados nos produtos carnes fermentados também é necessária e deve ser apresentada em todas as etapas da produção e distribuição (Fraqueza and Barreto 2015).

5.1. Controlo de perigos químicos nos produtos cárneos transformados

Os perigos químicos estão associados a um número significativo de alertas e é essencial a sua identificação, avaliação e controlo apropriado para reduzir a sua ocorrência e o seu impacto (Safefood 360° 2013). Os nitritos de potássio e sódio (E 249, E 250) e os nitratos de sódio e potássio (E 251, E 252) representam a principal preocupação dentro dos perigos químicos, contribuindo como um PCC devido ao seu risco para a saúde humana referida no capítulo 4 (Alahakoon et al. 2015). A formulação correta de produtos cárneos fermentados é uma medida preventiva, principalmente nos casos em que estão presentes estes aditivos químicos com potencial de toxicidade, se utilizados incorretamente. A quantidade em excesso de nitritos/nitratos pode ser evitada com o cálculo correto e a vigilância muito apertada na sua pesagem. A adição controlada de nitrito é geralmente considerada uma medida preventiva para *Clostridium* spp. mas a sua ação inibitória depende da dose inicial de esporos/g de carne (Christiansen et al. 1973; Fraqueza et al. 2018).

Neste contexto, a utilização de nitratos e nitritos são regulamentados como aditivos alimentares na União Europeia (UE) de acordo com o regulamento 1333/2008, e o limite máximo de nitrato permitidos em vegetais são definidos no Regulamento (CE) n. 1881/2006.

Para diminuir a probabilidade de expor os consumidores a estes fatores de risco, devem ser feitos esforços para os reduzir. Uma maneira simples para os reduzir é simplesmente eliminar o uso de nitrito e/ou nitrato, no entanto existe uma descaracterização dos produtos cárneos fermentados e um aumento da probabilidade de multiplicação de microrganismo patogénicos com produção de toxinas (Fraqueza et al. 2018). Outra medida preventiva em relação aos perigos químicos está relacionada com a seleção e controlo de fornecedores, sendo um pré-requisito importante pois evita problemas de segurança e qualidade nas matérias-primas e as suas consequências nos produtos finais (Fraqueza et al. 2018; Fraqueza and Barreto 2015). Para além da seleção e controlo dos fornecedores é necessária uma inspeção das matérias-primas e restantes ingredientes no ato de entrega como o controlo visual, análises físico-químicas e verificação da rotulagem/embalagem, para estabelecer uma boa rastreabilidade (Tabela 3) (Lücke 2015; Melero et al 2015).

Tabela 3: Medidas preventivas para controlar potenciais perigos identificados na produção de produtos fermentados. Adaptado Fraqueza and Barreto (2015)

Etapa de processamento	Identificação do perigo	Medidas preventivas
Receção: carne crua	Biológico	Seleção/controlo dos fornecedores (homologados e/ou certificados)
	Físico	Temperatura correta no ato de entrega (<7 °C) Controlo visual
Outros ingredientes		Seleção/controlo dos fornecedores (homologados e/ou certificados), controlo visual das datas de validade de acordo com os requisitos especificados
Água		De acordo com os requisitos específicos e legais de potabilidade
Materiais de embalagem		Seleção/controlo dos fornecedores (homologados e/ou certificados)
Armazenamento	Biológico	BPH e BPF, temperatura/Humidade relativa correta
Cortes e aparas de carne de suíno e bovino	Físico	Controlo visual
	Biológico	BPH e BPF
Picagem	Biológico	BPH e BPF
	Químico	Manutenção dos equipamentos
	Físico	Uso de compostos de limpeza não tóxicos compatíveis com alimentos
Pesagem dos ingredientes e aditivos	Químico	Controlo adequado na pesagem, segurança nas práticas operacionais de acordo com as instruções dos aditivos e requisitos legais, calibração das balanças
Mistura	Biológico e químico	BPH, tempo/temperatura corretos, manutenção preventiva dos equipamentos, uso de compostos de limpeza não tóxicos compatíveis com alimentos
Enchimento	Biológico e químico	BPH, BPF, tempo/temperatura corretos, uso de compostos de limpeza não tóxicos compatíveis com alimentos, manutenção dos equipamentos, pressão de enchimento correta
	Físico	Verificação visual, detetor de metais
Repouso	Biológico	BPH, tempo/temperatura corretos, medição do pH da carne por lote
Fermentação/Secagem/Fumagem	Biológico	BPH e BPF
	Químico	Tempo/temperatura/Humidade relativa corretos
Maturação/Estabilização	Biológico	BPH e BPF
	Químico	Tempo/temperatura/Humidade relativa corretos, controlo do pH e a_w no produto final
Embalagem/rotulagem	Biológico	BPH, BPF, manutenção dos equipamentos, controlo da selagem em vácuo e concentração de CO ₂ / O ₂ nas embalagens
	Químico	Monitorização da rotulagem
Armazenamento do produto final	Biológico	BPH, BPF, Tempo/temperatura/Humidade corretos
Distribuição	Biológico	BPH e BPF
	Químico	Tempo/temperatura/Humidade corretos
	Físico	

6. Alternativas aos processos tradicionais de cura

Nos últimos anos assistiu-se a uma aumento de procura de alimentos seguros e naturais que não recorram à adição excessiva de conservantes químicos (nitritos) (Alahakoon et al. 2015; Majou and Christieans 2018) e que mantenham uma aparência muito semelhante às carnes curadas tradicionalmente (Sebranek et al. 2012). Esta procura levou as indústrias de carne a encontrar formas de substituição dos nitritos por ingredientes alternativos (fontes naturais) com características semelhantes aos nitritos sem causar riscos para a saúde humana (Sindelar and Milkowski 2011). Assim, encontrar uma alternativa ao nitrito/nitrato que reproduza as mesmas propriedades sensoriais, não tóxico, eficiente a baixas concentrações, compatível com os alimentos, fácil de aplicar, estável durante o processamento e económica

é de grande importância (Lorenzo et al. 2018; Nikmaram et al. 2018). Neste contexto, as ervas aromáticas, ricas em nitratos, estão a alcançar um vasto interesse na indústria de carne pelas suas propriedades antibacterianas e antioxidantes, uma vez que também são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) (Sebranek and Bacus 2007; Vinceković et al. 2017). No entanto, as ervas aromáticas como manjericão, tomilho, sálvia e orégãos, se utilizadas em grandes quantidades, alteram o sabor dos alimentos. Portanto, a quantidade dessas especiarias deve ser minimizada para manter as propriedades organolépticas dos alimentos (Sebranek and Bacus 2007).

Podemos encontrar, na literatura existente, uma vasta gama de extratos de produtos naturais como substitutos do nitrito, tais como, aipo em pó (Sebranek et al. 2012; Sullivan et al. 2012; Gassara et al. 2016; Kawski et al. 2017; Jin et al. 2018; Posthuma et al. 2018;), salsa em pó (Riel et al. 2017), batata-doce em pó, paprica e mirtilo em pó (Jin et al. 2018), alecrim (Kawski et al. 2017), alface, espinafre, rabanete, entre outros e frutas devido às suas propriedades antibacterianas e antioxidantes (Gassara et al. 2016).

Para além das ervas aromáticas e plantas, vários estudos demonstraram que a presença de produtos químicos, como dióxido de enxofre, ácido etileno diamina tetra acético, hidroxianisol butilado (BHA), entre outros, são capazes de inibir microrganismos patogénicos e/ou a oxidação lipídica (Gassara et al. 2016). O uso de ácidos orgânicos, como agentes antimicrobianos, tais como, lactato, acetato, sorbato e benzoato, de bacteriocinas (nisina), proteínas antimicrobianas que inibem a atividade enzimática (Alahakoon et al. 2015), e as vitaminas, como o α -tocoferol, podem ser uma alternativa eficaz aos nitritos e nitratos nos produtos cárneos. Além disso, foi demonstrado que o α -tocoferol pode inibir a multiplicação de microrganismos patogénicos. Contudo, as vitaminas são muito dispendiosas o que encarece o processo (Gassara et al. 2016). Para além das alternativas acima descritas, um dos meios que melhora a segurança dos produtos “naturalmente curados” é a alta pressão hidrostática (HPP), uma tecnologia reconhecida como um tratamento eficaz (Fraqueza et al. 2018; Sebranek et al. 2012).

Neste trabalho apenas iremos focar o uso de plantas e ervas aromáticas como alternativa de uso à adição de aditivos químicos.

6.1 Alternativas baseadas no uso de plantas

Os vegetais são reconhecidos como uma fonte muito significativa de nitrato, com concentrações de 1.500 a 2.800 ppm, comumente encontrado no aipo, espinafre, acelga, alface e beterraba.

A substituição do nitrato por extratos vegetais ricos em nitrato tal como foi preconizado por Sebranek et al. (2012) pode ser útil para minorar a reação adversa do consumidor ao aditivo, no entanto, não resolve a raiz do problema, que é adicionar nitrito/nitrato ao produto

cárneo. Existem plantas que, devido ao seu alto nível de nitrato (Santamaria 2006) e à tradição de uso, podem ser de interesse para garantir um nível suficiente de nitrato capaz de controlar agentes patogénicos e o desenvolvimento de atributos sensoriais (Fraqueza et al. 2018).

Ao usar uma fonte natural de nitrato, é necessária a conversão do nitrato em nitrito realizada por microrganismos específicos, produtores de uma enzima nitrato redutase (NR) (Sebranek and Bacus 2007).

6.2. Problemas face ao uso de plantas e outros extratos naturais

Os produtos curados naturalmente apresentam características organolépticas semelhantes aos produtos curados tradicionalmente (Sindelar et al. 2007), no entanto apresentam níveis mais baixos de nitrito residual (Sebranek and Bacus 2007; Sindelar 2014). Isso geralmente ocorre devido à menor concentração adicionada de nitrito e também à menor conversão de nitrato em nitrito. Como resultado, existem preocupações sobre a inibição microbiológica nesses produtos (Sindelar 2014) atribuídos aos níveis mais baixos de nitrito (Jackson et al. 2011). Consequentemente, os produtos curados com extratos naturais podem permitir uma maior multiplicação de *C. perfringens* do que os produtos equivalentes convencionalmente curados (Taormina 2014).

6.3. Fatores que influenciam o teor de nitratos nas plantas

6.3.1. Definição de vegetais

A definição da palavra vegetal é tradicional e não científica e é um tanto arbitrária e subjetiva. Todas as partes comestíveis das plantas, incluindo hastes, caules, raízes, tubérculos, bolbos, folhas, flores e frutas, geralmente consumidos crus ou cozidos, como alimento pelos seres humanos, no todo ou em parte, são normalmente consideradas vegetais. Nozes, grãos, ervas, especiarias e frutas normalmente não são considerados vegetais (IARC 2003; EFSA 2008).

6.3.2. Nitrato nas plantas

Um dos fatores mais importantes, que caracterizam a qualidade dos vegetais, é o teor dos nitratos. Estes ocorrem naturalmente nas plantas, com potencial de acumulação, através do ciclo do nitrogénio, sendo que este é fixado por bactérias (Mensinga et al. 2003; Gassara et al. 2016). O nitrogénio é essencial para a nutrição e função das plantas sendo o principal fator limitante do seu crescimento na maioria das culturas (EFSA 2008). Geralmente, os vegetais acumuladores de nitrato pertencem às famílias de *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae* (beterraba, acelga, espinafre), *Amarantaceae*, *Asteraceae* (alface) e *Apiaceae* (aipo, salsa) (Santamaria 2006).

O nitrato é encontrado principalmente nos vacúolos celulares e é transportado no xilema, em conjunto com a água, no sentido das raízes para as folhas (EFSA 2008). Por conseguinte, a distribuição de nitrato entre as folhas e os órgãos de armazenamento (sementes, tubérculos) pode ser diferente. Posto isto, culturas de folhas como o repolho, a alface e o espinafre (vegetais folhosos) têm concentrações razoavelmente maiores de nitrato, em comparação com os órgãos de armazenamento como os tubérculos de batata, cenoura, cebola e feijões (EFSA 2008; Tamme 2010; Colla et al. 2018). Outra consequência do sistema de transporte é que as folhas jovens contêm menor concentração de nitrato do que as folhas mais velhas (Cintya et al. 2018), ou seja, existe um aumento na acumulação de nitrato dependente da idade com a ordem de pré-floração < floração < pós-floração (Sareer et al. 2016). O conteúdo de nitrato também difere consoante as partes da planta, observando-se maiores concentrações de nitrato nos pecíolos com a diminuição do seu teor pela seguinte ordem: pecíolo > folha > caule > raiz > inflorescência > tubérculo > bulbo > fruto > semente (Chen et al. 2004; Santamaria 2006).

Após a colheita, a captação de nitrato pelas raízes e o seu transporte através do xilema termina (Riens and Heldt 1992).

6.3.3. Fatores que influenciam a concentração de nitratos

As concentrações de nitrato nas plantas dependem de uma série de fatores (Dich et al. 1996; Amr and Hadidi 2001; Chung et al. 2004; Santamaria 2006; Tamme et al. 2010; Colla et al. 2018; Roila et al. 2018), tais como; (A) Fatores ambientais (Tipo de solo, Intensidade da luz e atividade da nitrato redutase endógena, entre outros); (B) Fatores agrícolas (Fertilizantes, Estação do ano, Região geográfica, Condições de armazenamento da colheita); e (C) Fatores biológicos da planta (Material genético, Espécie e Genótipo).

No entanto, os principais fatores que determinam a concentração de nitrato nas plantas são a intensidade da luz, a atividade da nitrato redutase endógena e o uso de fertilizantes nitrogenados (Amr and Hadidi 2001; Santamaria 2006; Umar and Iqbal 2007).

6.3.3.1. Fatores ambientais

6.3.3.1.1. Tipo de solo

O nitrato é um material natural nos solos e o seu fornecimento adequado é necessário para um bom crescimento das plantas. Logo, altos níveis de matéria orgânica no solo incentivam acumulação de nitrato nas plantas (Amr and Hadidi 2001).

6.3.3.1.2. Intensidade da luz e atividade do nitrato redutase endógena

Após a sua absorção, o nitrato pode ser reduzido a nitrito pela nitrato redutase (NR) (Cintya et al. 2018). A intensidade da luz é inversamente correlacionada com o teor de nitrato das plantas, portanto mudanças diurnas na intensidade da luz podem causar um padrão de acumulação de nitrato durante o dia (Umar and Iqbal 2007). Durante o ciclo diurno, verifica-se uma diminuição da NR ao fim da tarde, quando a intensidade luminosa é menor, como resultado da degradação e/ou bloqueio da síntese da NR (Umar and Iqbal 2007).

As folhas de plantas cultivadas sob baixa intensidade luminosa geralmente apresentam baixos níveis de NR acompanhada de um aumento de acumulação de nitrato (Colla et al. 2018) ao contrário das folhas de plantas cultivadas sob alta intensidade luminosa, que apresentam um aumento de atividade enzimática de NR resultando numa diminuição de acumulação de nitrato, ou seja, a intensidade da luz também afeta a estabilidade da NR (Umar and Iqbal 2007; Sareer et al. 2016).

Além disso a atividade da NR nas folhas diminuiu com o desenvolvimento da planta, isto é, existe um aumento na acumulação de nitrato com a idade da planta que resulta numa menor capacidade de NR (Sareer et al. 2016).

6.3.3.2. Fatores agrícolas

6.3.3.2.1. Fertilizantes

A concentração de nitrato no solo é potenciada por atividades humanas, como a aplicação de fertilizantes e resíduos orgânicos.

A acumulação de nitrato nos vegetais geralmente depende da quantidade e tipo de nutrientes presentes no solo e está intimamente relacionado com o tempo de aplicação, a quantidade e composição dos fertilizantes aplicados (Umar and Iqbal 2007).

A contaminação por nitrato e/ou nitrito nos vegetais é principalmente resultante da aplicação de fertilizantes químicos, especialmente fertilizantes nitrogenados (Chung et al. 2004). Os fertilizantes nitrogenados podem conter nitrogénio sob a forma de nitrato, amónio ou ureia (EFSA 2008; Gassara et al. 2016) e são altamente solúveis, biodegradáveis e facilmente absorvidos pelas plantas (Sareer et al. 2016). Com esta fertilização obtêm-se maiores rendimentos das plantas e acumulação de nitrato nas partes comestíveis das culturas. Contudo a sua aplicação excessiva aumenta o risco de acumulação de nitrato (Gonzalez et al. 2010; Gassara et al. 2016), um aumento do custo de produção e o risco de deterioração da qualidade da água devido à lixiviação de nitrato (Colla et al. 2018).

6.3.3.2.2. Estação do ano e região geográfica

A acumulação de nitrato varia de acordo com a estação do ano (Santamaria 2006). Culturas semeadas no inverno têm geralmente níveis mais altos de nitrato, quando prevalecem condições de pouca luminosidade, do que as culturas semeadas no verão (Weightman et al. 2006; Tamme et al. 2010; Roila et al. 2018).

Na Europa, as concentrações de nitrato são maiores em latitudes mais a norte devido à menor intensidade de luminosidade e menos horas de luz do dia (EFSA 2008; Weightman et al. 2006), ou seja, os níveis de nitrato tendem a ser mais altos nas amostras obtidas no norte da Europa em comparação com as cultivadas nos países mediterrânicos (sul da Europa) (EFSA 2008; Tamme et al. 2010). Essas diferenças podem ser explicadas pela maior irradiância solar no verão, que tende a reduzir o nitrato e também pelas taxas de crescimento mais altas (Weightman et al. 2006).

6.3.3.2.3 Condições de armazenamento da colheita

Os níveis de nitrito são geralmente baixos em vegetais frescos em comparação com os níveis de nitrato (Chung et al. 2004; Cintya et al. 2018).

A redução pós-colheita de nitrato baseia-se na conversão do nitrato acumulado em nitrito, que pode ser influenciado pelas condições de manuseamento e armazenamento pós-colheita. No pós-colheita, os fatores críticos para a redução de nitrato (via redução microbiológica) incluem, processamento de alimentos e temperatura de armazenamento (temperatura ambiente e refrigeração) (EFSA 2008; Kyriacou et al. 2019).

A temperatura e o tempo de armazenamento afetam os níveis de nitrito e nitrato (Cintya et al. 2018). Durante o armazenamento de vegetais frescos, quanto maior for o tempo de armazenamento, maior o teor de nitrito e nitrato. Relativamente à temperatura de armazenamento é mais provável existirem mudanças no teor de nitrato e nitrito à temperatura ambiente do que no armazenamento sob refrigeração (Chung et al. 2004; Cintya et al. 2018; Colla et al. 2018). Ou seja, a maneira mais apropriada de armazenamento de vegetais que contêm nitrato é sob refrigeração, pois evita a formação de nitritos bacterianos (previne a atividade bacteriana) e inativa a NR endógena da planta (Chung et al. 2004; EFSA 2008).

6.4. Caracterização das ervas aromáticas

As ervas aromáticas têm sido cultivadas desde os tempos antigos e utilizadas especialmente para fins culinários (Özcan and Akbulut 2007). A principal forma comercializada de ervas aromáticas é a seco, principalmente porque os materiais vegetais secos são fáceis de transportar, comercializar e podem ser armazenados por longos períodos de tempo.

A secagem e a congelação são os métodos mais comuns para conservar ervas aromáticas. A secagem de produtos frescos tem por objetivo estabilizar a multiplicação microbiana e as reações químicas e enzimáticas devido à diminuição da atividade da água (a_w), de forma a manter o produto conservado e disponível, no entanto, também podem afetar negativamente a aparência do produto e levar à perda de aroma e compostos bioativos (Liburdi et al. 2017).

O manjericão (*Ocimum basilicum*), a sálvia (*Salvia officinalis*), os orégãos (*Origanum vulgare*) e o tomilho (*Thymus vulgaris*) pertencentes à família *Lamiaceae*, são plantas perenes e economicamente importantes para os países mediterrânicos. As folhas de manjericão possuem atividade antibacteriana, inseticida e antioxidante (Cindrić et al. 2013; Borugă et al. 2014; Gavrić et al. 2018; Sonmezdag et al. 2018; Fraj et al. 2019; Samani et al. 2019).

A sálvia tem sabor apimentado e é usada como condimento. Extratos e óleos essenciais de *S. officinalis* têm atividade biológica e atividades anti-inflamatórias (Baricevic et al. 2001; Bozin et al. 2007).

As folhas secas de orégãos são extremamente ricas em propriedades antioxidantes e o seu óleo essencial é rico em carvacrol, timol, c-terpineno e p-cimeno, sendo utilizado para vários fins medicinais. Acredita-se que apresentem propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, entre outras (Skoufogianni et al. 2019).

O tomilho é amplamente utilizado em todo o mundo pelas suas propriedades expetorantes, antibacterianas, antiespasmódicas e outras (Kasparaviciene et al. 2018). Acredita-se que há evidências de atividade antimicrobiana nomeadamente contra: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* (Borugă et al. 2014); *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Pantoea* spp. (Imelouane et al. 2009), *Bacillus* spp., *Shigella* spp., *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. e *Aspergillus niger*.

II - Trabalho experimental: Aplicação de infusões de ervas aromáticas para substituição de aditivos químicos num modelo de carne fermentado

1. Objetivos e justificação

Com este trabalho pretendeu-se estudar formas de substituir o uso de aditivos químicos (nitrato e nitrito) por ingredientes naturais, tais como ervas aromáticas, avaliando a evolução da microbiota tecnológica e características sensoriais do produto cárneo-modelo. O uso de ingredientes naturais configura-se como uma excelente oportunidade para a promoção da imagem dos produtos tradicionais, aumentando a confiança dos consumidores, e consequentemente a sustentabilidade do sector. Neste contexto, os objetivos do trabalho são:

1. Avaliar o uso de infusões das ervas aromáticas, Manjerição Rubra, Tomilho Limão, Orégãos vulgar e Sálvia Ananás para substituição dos aditivos nitrato e nitrito na formulação de produtos cárneos;

2. Caracterizar sob o ponto de vista físico-químico, microbiológico e sensorial um produto cárneo modelo usando as infusões de ervas aromáticas (ingredientes não classificados como aditivos) como substituição dos aditivos nitrato e nitrito.

2. Material e Métodos

2.1. Produção das ervas aromáticas

Neste estudo foram utilizadas as ervas aromáticas de Manjerição Rubra (*Ocimum basilicum* var. *purpurascens*), Tomilho Limão (*Thymus citrodorus*), Sálvia Ananás (*Salvia elegans* var. *ananas*) e Orégãos (*Origanum vulgare*) devido às suas características e por ser comum o seu cultivo em Portugal sendo usadas no tempero de carne.

Estas ervas aromáticas secas foram recebidas no Laboratório de Tecnologia dos Produtos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária, provenientes da Cooperativa CERCICA (Cooperativa para a educação e reabilitação de cidadãos inadaptados de Cascais). A CERCICA possui uma área de 1.5 ha convertida a modo de Produção Biológico. Inserida nesta área encontra-se uma estufa de produção com cerca de 400 m², com sistema de rega automatizado em cama quente. Nesta área foram produzidas as espécies em experimentação no âmbito do projeto.

2.1.1 Ervas aromáticas

Numa primeira fase foram plantadas em vaso as “planta-mãe” selecionadas, numa estufa. Efetuou-se a sua propagação em tabuleiros e vasos e foram então plantadas em maior número nos terrenos da CERCICA (Figura 3), em Cascais, entre os meses de março e setembro de 2019, com irrigação gota a gota.



Figura 3: Terreno onde foram produzidas as espécies em experimentação no âmbito do projeto; A - Manjeriçã rubra; B - Sálvia ananás; C – Orégãos; D - Tomilho limão.

2.1.2. Secagem das ervas aromáticas

Após colheita as ervas aromáticas foram selecionadas eliminando todo o material comprometido e outras plantas que não as das mesmas espécies, registando-se o seu lote (data de colheita, espécie, código do lote, etc.). As ervas foram colocadas em caixas para secagem, em camadas não compactadas. Foi efetuado um controlo da temperatura (intervalo de temperatura entre 30 °C e 40 °C) e humidade relativa (HR%) com o auxílio de um Termo higrómetro portátil (HANNA HI 9564, Portugal) que tornou este processo mais eficiente e garantiu melhor qualidade do produto final. Todas as ervas aromáticas foram secas num secador artesanal, revestido a pinho não tratado que contém 4 ventoinhas extratoras e 2 tubos de entrada de ar (Figura 4).



Figura 4: Termo higrómetro portátil e Secador artesanal de ervas aromáticas, CERCICA.

No processo de secagem as ervas aromáticas foram pesadas à entrada e saída. A secagem teve uma quebra igual ou superior a 70%, com um teor de humidade máxima admitida de 12% no produto final.

O acondicionamento e armazenamento foram efetuados em contentores adequados (*big bags*); em local seco e bem arejado, elevados sobre uma plataforma e em local protegido

contra insetos voadores e rastejantes. Cada lote foi acompanhado de uma ficha técnica completa que permite saber informações sobre a planta e modo de cultivo.

2.2. Preparação de infusões das ervas aromáticas

Para a preparação das infusões foram seleccionadas as folhas das plantas aromáticas em estudo, procedendo-se à sua homogeneização com o auxílio duma picadora elétrica (Flama 1705 FL, Portugal) (Figura 5).



Figura 5: A- Picadora elétrica Flama; B- Balança com resolução de 0,001g, Sartorius analytic.

De cada homogeneizado, foram pesadas numa balança com resolução de 0,001g (Sartorius analytic A200s, USA) três tomas de 5,0 g (Figura 5). Cada toma foi transferida para um balão Erlenmeyer de 250 ml. Adicionou-se 100 ml de água destilada aquecida e mantida a 80 °C durante 10 e 20 min. sendo esta infusão homogeneizada com o auxílio de um agitador magnético (IKA, C-MAG HS IKAMAG, Alemanha) (Figura 6).

No fim do tempo estabelecido a infusão foi arrefecida e filtrada em papel-filtro qualitativo (Whatman 1, Reino Unido) com a adição de carvão ativado (Merck, Alemanha) a fim de se obter um filtrado límpido e incolor (Figura 6).



Figura 6: Preparação de infusões de ervas aromáticas; agitador magnético mantido a 80 °C e filtração com adição de carvão ativado da erva aromática manjerição rubra.

2.3. Aplicação de infusões de ervas aromáticas num produto cárneo modelo

2.3.1. Desenho experimental

O trabalho experimental consistiu na produção de formulações de modelos cárneos com manjerição rubra, tomilho limão, sálvia ananás e orégãos. As produções foram realizadas em três ensaios independentes (n=3) ou seja, dias de fabrico diferentes. No primeiro ensaio usaram-se aparas de carne de suíno 80/20 (Monte D'alva-alimentação SA, Lote O0529) e no segundo e terceiro ensaio aparas de carne de suíno (70/30) (Monte D'Alva- alimentação SA, Lote V1409). Foram realizadas seis formulações, com diferentes concentrações de nitrato de sódio (mg) por quilograma de produto cárneo (Tabela 4), correspondentes a: a) Controlo modelo cárneo sem nitrato adicionado com 0 ppm nitrato de sódio (C); b) modelo cárneo com infusão de Manjerição rubra com 70 ppm nitrato de sódio (T1) c) modelo cárneo com infusão de Tomilho limão com 70 ppm nitrato de sódio (T2); d) modelo cárneo com infusão de Manjerição rubra com 100 ppm nitrato de sódio (T3); e) modelo cárneo com infusão de Sálvia ananás com 100 ppm nitrato de sódio (T4); f) modelo cárneo com infusão de Orégãos com 100 ppm nitrato de sódio (T5).

Tabela 4: Formulações dos modelos cárneos; Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjeriçã rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjeriçã rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

Ingredientes	Formulações					
	C	T1	T2	T3	T4	T5
Aparas (1,5 kg)	X	X	X	X	X	X
Sal (1,5%)	X	X	X	X	X	X
Infusão (20%)		Manjeriçã rubra	Tomilho limão	Manjeriçã rubra	Sálvia ananás	Oregãos
Nitrato de sódio (ppm)		70	70	100	100	100
Água (20%)	X					

2.3.2. Fabrico do produto

Em cada ensaio, 9 kg de aparas de carne de suíno, previamente pesada numa balança digital (Bizerba, EC 100E, Portugal), foi picada em picadora Braher (modelo P22-82, Espanha) e homogeneizada com 1,5% de sal fino (Pingo Doce, lote 364829, Portugal) numa misturadora (Hobart, A200, USA) (Figura 7).



Figura 7: Fabrico do produto; A- Aparas de carne de suíno; B- Picagem das aparas de carne; C- Homogeneização das massas cárneas; D- Enchimento das massas em tripas naturais de carneiro.

A massa homogeneizada foi dividida em 6 parcelas diferentes com 1,5 kg cada. Para cada 1,5 kg de massa foi incorporado e emulsionado durante 2 min. 20% das infusões ou água, previamente geladas, de acordo com as respetivas formulações (Figura 8).

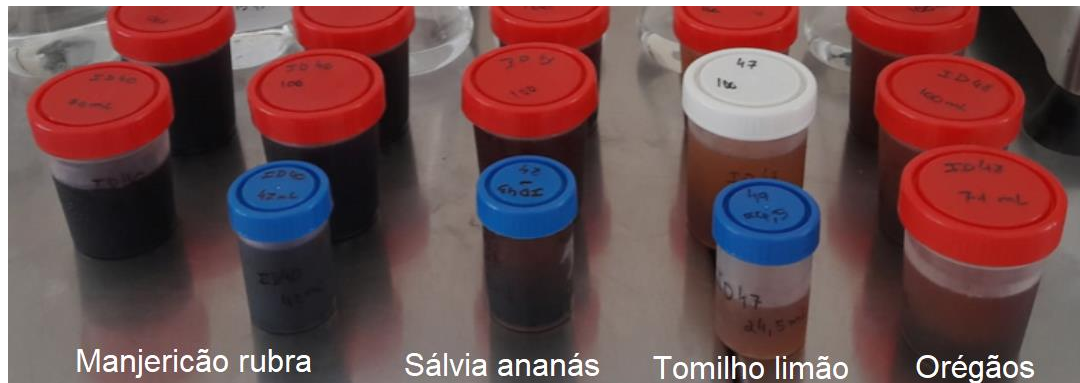


Figura 8: Infusões, previamente geladas, para incorporação nos modelos cárneos

De seguida procedeu-se ao enchimento das massas em tripa natural de carneiro (Luis Sanchez & Filhos Ida, Abrunheira, Lote 180425, 22/24) numa enchedora (Talsa, Espanha) (Figura 7).

Os produtos cárneos foram acondicionados em caixas e armazenados em câmara frigorífica no escuro, a 4 °C durante quatro dias.

Foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas às amostras de cada lote de fabrico recolhidas aos 0, 2 e 4 dias de armazenamento. A medição de cor foi realizada nas amostras cruas e cozidas. As amostras destinadas à prova sensorial e correspondentes ao dia 0 foram conservadas a -20°C até ao dia da análise.

O fabrico do produto está esquematizado no fluxograma da Figura 9.

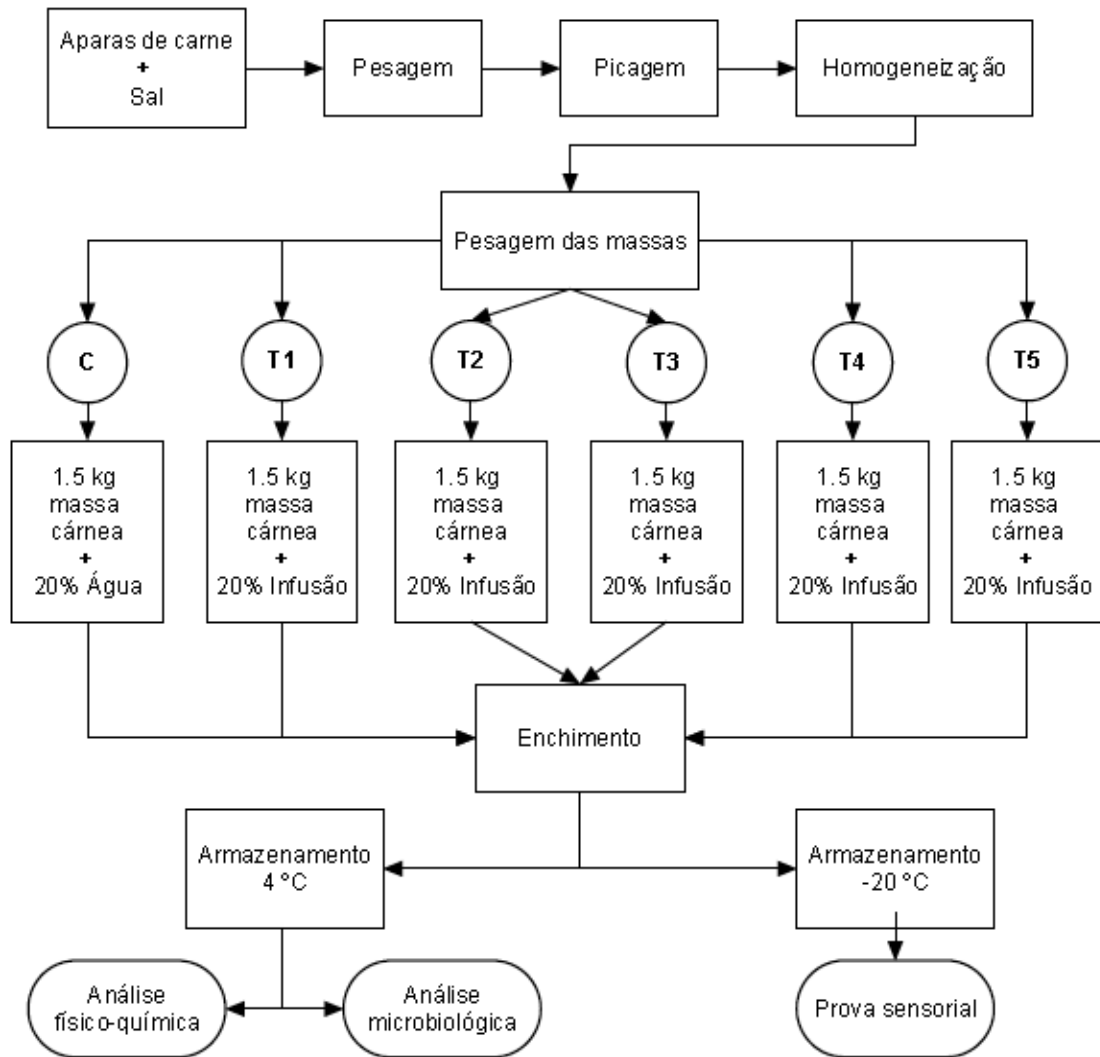


Figura 9: Fluxograma do desenho experimental do produto cárneo modelo.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

2.4. Análises microbiológicas

A colheita das amostras e a implementação dos métodos analíticos para controlo microbiológico tiveram por base os requisitos descritos nos normativos da *International Organization for Standardisation* (ISO).

As amostras armazenadas numa arca frigorífica a 4 °C foram analisadas nos dias 0, 2 e 4 (Figura 10), realizando-se as contagens de Aeróbios totais a 30 °C (AT), *Enterobacteriaceae* (Entero), Bactérias Ácido Lácticas (BAL) e *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN).

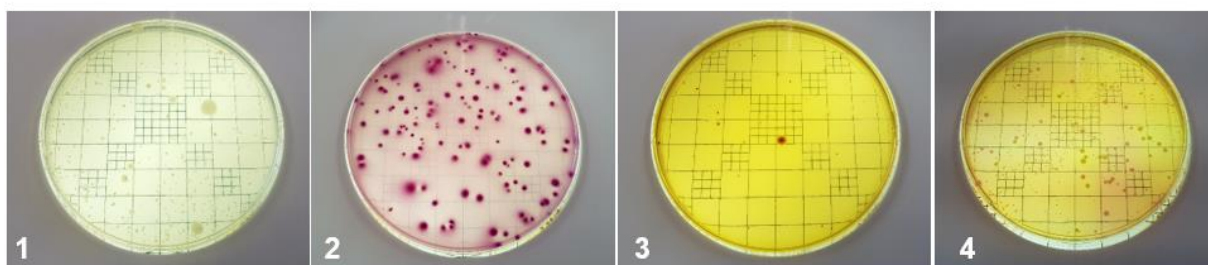


Figura 10: Caixas de Petri com unidades formadoras de colónias (UFC) correspondentes a contagens de 1- Aeróbios totais a 30 °C (AT); 2 - *Enterobacteriaceae* (Entero); 3 - Bactérias Ácido Lácticas (BAL) e 4 - *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN).

2.4.1. Preparação da amostra

A preparação das amostras foi realizada de modo a evitar qualquer tipo de contaminação do operador ou do meio ambiente. Antes da preparação e análise das amostras, as bancadas foram desinfetadas com álcool a 70°C, todos os utensílios de trabalho encontravam-se esterilizados e todo o trabalho foi realizado junto a um bico de Bunsen. A preparação da amostra foi feita seguindo as recomendações da Norma ISO 6887-2 (1999). Pesaram-se 10g de amostra retirando aleatoriamente frações para um saco esterilizado de Stomacher (blender bag, VWR STERILE, USA) e adicionaram-se 90 ml de Triptona sal (Scharlau, Espanha). Após homogeneização num Stomacher Lab – Blender 400 (Bagmixer 400, França) (Figura 11) durante 60 segundos, procedeu-se à preparação das diluições decimais pretendidas, a partir desta suspensão inicial 10^{-1} .



Figura 11: Stomacher Lab – Blender 400

Utilizaram-se diluições seriadas de 1 ml de cada amostra e semeou-se por incorporação 1 ml do inóculo das diluições escolhidas em caixa de Petri (Figura 12).



Figura 12: Bancada de trabalho; Caixas de Petri inoculadas para contagem de 1- Aeróbios totais a 30 °C; 2- *Enterobacteriaceae*; 3- Bactérias Ácido Lácticas e 4- *Staphylococcus coagulase* negativa.

2.4.2 Contagem de Aeróbios totais a 30 °C

A contagem de aeróbios totais a 30 °C foi determinada de acordo com a ISO 4833-1(2003). A sementeira de 1 ml de inóculo por incorporação foi realizada em meio de cultura de TGA agar (Tryptose Glucose Extract Agar, Scharlau, Espanha), previamente fundido e mantido a 47 °C em banho de água. Após homogeneização do inóculo no meio de cultura por movimentos circulares, e após arrefecimento até solidificar, as caixas foram incubadas em estufa a 30 °C durante 48 horas. Os resultados finais foram expressos em log₁₀ em unidades formadoras de colónias por grama de amostra (log ufc/g).

2.4.3. Contagem de *Enterobacteriaceae*

A contagem de *Enterobacteriaceae* foi realizada de acordo com a ISO 21528-2 (2004). A sementeira de 1 ml de inóculo por incorporação foi realizada em meio de cultura VRBD agar (Violet Red Bile Dextrose, Scharlau, Espanha), previamente fundido e mantido a 47 °C em banho de água. Após homogeneização do inóculo no meio de cultura utilizado, as caixas foram incubadas durante 48 horas a uma temperatura de 37 °C. Foram efetuadas contagens de colónias características presentes (cor rosa a vermelho, com ou sem halo de precipitação de sais biliares, ou incolores, mucosas). Os resultados foram expressos em log₁₀ em unidades formadoras de colónias por grama de amostra (log ufc/g).

2.4.4. Contagem de Bactérias Ácido Lácticas (BAL)

A contagem de bactérias ácido lácticas foi determinada de acordo com a ISO 15214 (1998). A sementeira de 1 ml de inóculo por incorporação foi realizada em meio MRS agar (Man Rogosa & Sharpe Agar, Scharlau, Espanha), previamente fundido e mantido a 47 °C, enriquecido com trifetil tretazol a 1% (Fisher, Reino Unido) e acetato de tálio a 5% (Merck,

Alemanha). A incubação foi feita a uma temperatura de 30 °C em condições de anaerobiose com um gerador para cultura em jarra (GENbox aerobiose, bioMérieux, França), durante 48 horas. Procedeu-se à contagem das colónias vermelhas ou rosadas presentes expressa em \log_{10} das unidades formadoras de colónias por grama (\log ufc/g).

2.4.5. Contagem de bactérias *Staphylococcus coagulase negativa*

A contagem de bactérias *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) foi feita de acordo com Leroy et al. (2015). A sementeira de 1 ml de inócuo por incorporação foi realizada em meio, MSA agar (Mannitol Salt Agar, Scharlau, Espanha), previamente fundido e mantido a 47 °C. A incubação foi feita a uma temperatura de 30 °C durante 48 horas. Os resultados finais foram expressos em \log_{10} em unidades formadoras de colónias por grama de salsicha (\log ufc/g).

2.5. Análises físico-químicas

2.5.1. Preparação da amostra

Cada amostra foi previamente homogeneizada com uma picadora elétrica (Flama 1705 FL, Portugal) e armazenada num frasco completamente cheio e fechado hermeticamente, de modo a evitar deterioração e alteração na sua composição. A amostra foi analisada dentro de 24 h subsequentes à sua preparação.

No caso dos produtos não cozidos, efetuou-se a análise imediatamente após a homogeneização da amostra.

As cozeduras dos modelos cárneos foram efetuadas em banho de água a 80°C (Concessus N350T, Portugal) medindo o centro térmico com auxílio de um termómetro Infrared (HANNA instruments HI 99556, Portugal) até atingir 65°C, mantendo-se a cozedura por mais 10 min. (Figura 13).



Figura 13: Apresentação dos modelos cárneos do dia 0, antes da cozedura, Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO_3); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO_3); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO_3); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO_3); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO_3); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO_3) e método de cozedura dos modelos cárneos.

2.5.2. Determinação do teor de nitratos

O conteúdo de nitratos foi determinado de acordo com a norma portuguesa (NP) 1847-1 (2009). No caso do modelo cárneo, a extração foi realizada em duplicado, por meio de água quente e filtração. A determinação de nitratos nas infusões foi realizada em triplicado. O filtrado foi analisado segundo o método de redução dos nitratos a nitritos pelo cádmio metálico (Merck, Alemanha) com obtenção de uma coloração vermelha por adição de cloreto de sulfanilamida e de cloreto de N-(1-Naftil) etileno-diamina (Riedel de Haen, USA) e medição fotométrica a um comprimento de onda de 538 nm em espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000, USA) (Figura 14). Os resultados foram expressos em mg de nitrato de sódio por 100 ml de infusão de acordo com Kmecl e Znidarčič (2015) e expressa em mg de nitrato de sódio por quilograma de amostra do modelo cárneo.



Figura 14: A- Coluna de cádmio; B- Espectrofotómetro, *Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000*

2.5.3. Determinação do teor de nitritos

O conteúdo de nitritos foi determinado nas infusões em triplicado, de acordo com o método oficial AOAC 973.31, e os resultados foram expressos em mg de nitrito de sódio por 100 ml de infusão. No produto cárneo a determinação foi realizada em duplicado e expressa em mg de nitrito de sódio por quilograma de amostra. No caso do modelo cárneo, a extração foi realizada por meio de água quente e filtração. O filtrado foi analisado com obtenção de uma coloração vermelha por adição de cloreto de sulfanilamida e de cloreto de N-(1-Naftil) etileno-diamina (Riedel de Haen, USA) e posterior medição fotométrica a um comprimento de onda de 538 nm num espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000, USA) (Figura 14).

2.5.4. Determinação do teor dos cloretos

A determinação de cloretos de um produto à base de carne foi realizada após fabrico, em duplicado, conforme a norma portuguesa (NP) 1845 (1982) e entende-se pela quantidade total de iões cloro (Cl) expressa em percentagem de cloreto de sódio (% NaCl). O processo consiste na extração dos cloretos a quente e respetiva precipitação por um excesso de nitrato de prata 0,1N (Fisher, Reino unido). A titulação desse excesso é efetuada com tiocianato de potássio (Chem-lab NV, Bélgica) na presença do alúmen férrico como indicador.

2.5.5. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada de acordo com a Norma portuguesa (NP) 3441 (2008), em triplicado nos dias 0, 2 e 4, com o auxílio de um potenciómetro digital portátil (Hanna HI 9025, 2004) equipado com um elétrodo de vidro de penetração e um sensor de temperatura (Figura 15). A determinação do pH iniciou-se com a calibração do aparelho utilizando soluções-tampão padrão de pH conhecido, pH=4,00 e pH=7,00 a 20 °C (temperatura ambiente). Após cada leitura, o elétrodo foi lavado com água destilada e colocado numa solução de armazenamento CIK (3 M). Para cada amostra foram realizadas três determinações, com a precisão de 0,05 unidades até obtenção de valor constante. O resultado final foi obtido da média aritmética dos valores de três determinações.



Figura 15: Potenciómetro digital portátil.

2.5.6. Determinação da Cor

A cor foi determinada nas amostras cruas e após cozedura. Para cada amostra foram realizadas três determinações, utilizando-se a média aritmética dos valores obtidos nas três determinações na análise estatística.

A cor foi medida por um colorímetro (Minolta CR-300, Japão) baseado no espaço de cor pelo método da Comissão Internacional de l'Eclairage (CIE Lab system), expressa pelos parâmetros L* (luminosidade), a* (vermelho / verde) e b* (amarelo / azul) (Figura 16). Antes das análises o aparelho era devidamente calibrado usando uma placa de calibração com os seguintes valores na escala de Lab, L-97,26; a-0,29; b-1,77. A cor foi determinada a partir de

três superfícies aleatórias nas amostras cruas e cozinhadas, previamente homogeneizadas, nos dias 0, 2, e 4. A média das três determinações foi apresentada como valor final por amostra. A espessura da amostra a analisar foi entre 12 e 15 mm, impedindo a infiltração de luz por baixo da caixa da amostra usada na análise.



Figura 16: Colorímetro Minolta CR-300.

2.6. Análise sensorial

Visando avaliar eventuais efeitos das infusões de ervas aromáticas nas características sensoriais dos modelos cárneos, realizou-se uma abordagem analítica sensorial. Foi realizada uma prova de consumidores com um teste JAR – *Just About Right*, com três grupos focais (GF), e uma avaliação hedónica, de acordo com a metodologia descrita por Popper et al. (2005). Os GF foram utilizados para identificar as potenciais implicações das infusões de ervas aromáticas no cheiro e na cor dos produtos. O teste JAR foi realizado para quantificar o impacto que as utilizações das infusões de ervas aromáticas tiveram na apreciação hedónica dos modelos cárneos.

2.6.1. Preparação e condições técnicas de apresentação da amostra para a realização da análise sensorial

Os modelos cárneos, conservados em congelação ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) foram descongelados em refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante cerca de 24h. O processo de cozedura dos modelos cárneos foi efetuado, tal como está descrito, em 2.5.1.-Preparação da amostra. As amostras foram arrefecidas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e cortadas em segmentos com cerca de 2 cm (Figura 17). Antes da prova, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente durante 1 hora para serem analisadas a uma temperatura mais favorável à libertação de compostos aromáticos.



Figura 17: Local onde decorreu a prova sensorial (Laboratório de Tecnologia dos Produtos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária); Amostras dos modelos cárneos, cortadas em segmentos com cerca de 2 cm.

Junto às amostras foi colocada uma ficha com o questionário para a análise sensorial utilizando uma escala *Just About Right* (JAR) (Figura 18).

FICHA DE PROVA (salsicha)

Nome:	Idade	
É consumidor habitual de produtos cárneos	Sim	Não

São-lhe apresentadas várias amostras de salsicha

Como classificaria de um modo geral a salsicha que provou?									AMOSTRA
Adoro	Gosto muito	Gosto	Gosto ligeiramente	Nem gosto nem desgosto	Não gosto muito	Não gosto	Não gosto nada	Detesto	
9	8	7	6	5	4	3	2	1	

Considere a COR da salsicha ideal (situe-se no rosa característico do fiambre). Indique se acha que acor está muito ou pouco intenso para si.

Muito pouco intensa	Pouco intensa	Ideal	Intensa	Muito intensa
1	2	3	4	5

Considere o CHEIRO da salsicha ideal para si. Indique se acha que o aroma a ervas especiarias está muito ou pouco intenso para si.

Muito pouco intenso	Pouco intenso	Ideal	Intenso	Muito intenso
1	2	3	4	5

Figura 18: Ficha da prova sensorial.

Na escala, de 5 pontos, JAR criada, os consumidores avaliaram os atributos dos modelos cárneos desde a opção “muito pouco intensa” até “muito intensa”, para a cor e cheiro, sendo o ponto intermédio o ideal (*Just About Right*). A resposta sobre a classificação geral e o aspeto dos modelos cárneos, foi apresentada através duma escala hedónica de 1 a 9 pontos, variando entre “detesto” correspondente a 1 e “adoro” correspondente a 9.

2.6.2. Grupos focais

Inicialmente foi feita uma apresentação sumária dos objetivos do GF e o animador obteve autorização de todos os elementos para fazer registo áudio da discussão (Figura 17). Os grupos focais foram conduzidos por um investigador com experiência na animação desta metodologia em análise sensorial, com registo áudio, começando pela apresentação dos participantes, incluindo género, idade e hábitos de consumo de produtos cárneos. A composição dos grupos focais é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Composição dos grupos focais.

Grupos Focais		Local	Género	Idade	Consumidor habitual P.C.
1	Lisboa		2 homens; 6 mulheres	19-55 anos	100 %
2	Lisboa		3 homens 4 mulheres	24-50 anos	100 %
3	Lisboa		4 homens 3 mulheres	25-63 anos	100 %

Por cada amostra, pediu-se aos participantes para se concentrarem inicialmente na avaliação da cor e do cheiro das ervas aromáticas. Na avaliação da cor, indicou-se aos participantes para considerarem como referência a cor rosa característica dos afiambrados de suíno. De seguida pediu-se aos participantes para descrever as características de sabor (*flavour*) percecionadas. A discussão foi guiada no sentido de explorar as notas apontadas pelos participantes, assim como determinar quais as que foram mais apreciadas ou depreciadas. Durante a discussão, o animador convidou os elementos menos participativos a intervir, para evitar o efeito de liderança de alguns elementos, que por vezes enviesa os resultados obtidos.

No encerramento da sessão, apresentou-se aos participantes o conjunto das seis amostras simultaneamente para poder fazer uma análise comparativa; o animador destacou as características mais referidas pelo grupo para o conjunto de amostras provadas, assim como o efeito que essas características tiveram na apreciação hedónica.

2.7. Análise estatística

No tratamento dos resultados obtidos dos parâmetros avaliados nas infusões de ervas aromáticas e nas formulações concebidas em modelos cárneos recorreu-se à análise descritiva utilizando o software IBM-SPSS Statistics 24.0. Os resultados físico-químicos obtidos nas diferentes infusões foram analisados estatisticamente de duas maneiras: a primeira consistiu em comparar o conteúdo de nitritos (mg/100ml) e nitratos (mg/100ml) das infusões de ervas aromáticas consoante o tempo de extração (10 min. e 20 min.); a segunda consistiu em comparar o teor de nitritos (mg/100ml) e o teor de nitratos (mg/100ml) entre as várias infusões de ervas aromáticas.

Recorreu-se ao teste One-way ANOVA para comparar a variação das médias obtidas nos parâmetros analíticos físico-químicos e microbiológicos das seis fórmulas de modelos cárneos ao longo do tempo e entre tratamentos e como teste de comparação múltipla de médias foi utilizado o teste de Tukey para um nível de probabilidade de 5%, 1% e 0,1%.

Os dados da prova sensorial foram submetidos à análise descritiva e *Penalty Analysis*, com 5 níveis JAR, utilizando-se o programa XLSTAT versão 2019, considerando o nível de significância de 5%.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização das infusões de ervas aromáticas

O teor de nitratos (média e desvio padrão) das infusões de ervas aromáticas em estudo estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para o parâmetro nitratos (mg/100ml) para as infusões de ervas aromáticas

Condições	Manjeriçã Rubra		Sálvia Ananás		Tomilho Limão		Oregãos		Valor F	sig	
Tempo (min)	N	Média±SE	N	Média±SE	N	Média±SE	N	Média±SE			
Nitratos (mg/100mL)	10	6	62.069±2.689 ^a	3	63.124±3.280 ^a	6	47.566±6.435 ^b	3	50.283±10.199 ^{ab}	8.812	**
	20	5	64.874±4.686	3	60.025±5.483	6	52.410±17.282	3	58.823±5.275	1.106	NS
Total	11	6	63.344±3.814 ^a	6	61.575±4.383 ^{ab}	12	49.988±12.688 ^b	6	54.553±8.638 ^{ab}	5.173	**
Valor F			1.559		0.706		0.414		1.659		
sig			NS		NS		NS		NS		

a-b Os números com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjeriçã rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjeriçã rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Oregãos 100 ppm NaNO₃). NS – diferenças não significativas; ** - diferenças estatisticamente significativas para P≤0,01; ± desvio padrão.

Os valores obtidos do conteúdo de nitratos (mg/100ml) nas diferentes infusões de ervas aromáticas não diferiram (P>0.05) em função do tempo de extração realizado (10 min. e 20 min.) Contudo verificou-se diferenças significativas (P≤0,01) quanto ao teor de nitratos de cada erva aromática. Assim, observando os valores obtidos para o tempo de extração de

10 min. do conteúdo de nitratos (mg/100ml) das várias infusões de ervas aromáticas registou-se que o teor de nitratos da infusão com tomilho limão (47.566 mg/100ml) era idêntica à obtida com orégãos mas significativamente mais baixo do que a obtida com manjerição rubra (62.069 mg/100ml) e com sálvia ananás (63.124 mg/100ml). Quando o tempo de extração da infusão foi de 20 min. observou-se que o conteúdo de nitratos (mg/100ml) entre as várias infusões de ervas aromáticas não foi diferente entre si ($P > 0.05$). Assim decidiu-se considerar os teores das infusões independentemente do tempo de extração (10 min. e 20 min.) verificando-se que existiam diferenças significativas ($P \leq 0,01$) entre a infusão de tomilho limão (49.988 mg/100ml) e a de manjerição rubra (63.344 mg/100ml). O tomilho limão tem menor conteúdo de nitratos que as restantes infusões de ervas aromáticas e o manjerição rubra contém o maior conteúdo de nitratos de entre todas infusões de ervas aromáticas.

Na erva aromática Manjerição Rubra obteve-se uma concentração de nitratos de 12563.19 mg/kg. Bahadoran et al. (2016) determinou nitratos no manjerição (2360 mg/kg) e classificou o seu teor como alto. Outros autores Tamme et al. (2010) e Özcan e Akbulut (2007), nas folhas frescas de manjerição, obtiveram valores que variaram entre 4695 mg/kg e 174,26 mg/kg usando métodos analíticos diferentes tais como cromatografia líquida de alta eficiência ou alta performance (HPLC) ou através do método do ácido fenol dissulfónico com medição fotométrica. Também Chang et al. (2013) determinou as concentrações de nitrato no manjerição, através do método espectrométrico de absorção molecular ao longo de 24 h para determinar se o tempo de colheita e se diferentes partes comestíveis do manjerição (Folhas, pecíolos e flores) afetavam as concentrações de nitratos nos vegetais crus. Estes autores concluíram que a intensidade de luz e as diferentes partes comestíveis (Folhas, pecíolos e flores) afetavam as concentrações de nitratos; com maiores concentrações de nitrato 3 h após o pico da intensidade da luz (2777 ppm); valores mais baixos (165-574 ppm) durante o período escuro; e aumento no conteúdo de nitratos com a ordem decrescente pecíolos < Flores < folhas, como referido nos capítulos 6.3.2. Nitrato nas plantas e 6.3.3.1.2. Intensidade da luz e atividade do nitrato redutase endógena.

Nas ervas aromáticas Sálvia ananás e Tomilho limão, obteve-se uma média de concentração de nitratos de 12220.15 mg/kg e 9448.59 mg/kg, respetivamente. Özcan e Akbulut (2007), usando um método analítico diferente (o método do ácido fenol dissulfónico com medição fotométrica), determinaram para *Salvia aucheri* 30.60 mg/kg de nitratos, para a *Salvia fruticosa* L 46.27 mg/kg e não detetaram conteúdo de nitratos para *Thymbra spicata* L. Contudo, Tamme et al. (2010) determinou 4290 mg/kg de nitratos nas folhas frescas de tomilho limão utilizando outro método analítico tal como a cromatografia líquida de alta eficiência ou alta performance (HPLC).

Observando os valores obtidos neste trabalho e comparando com os outros autores percebemos que as concentrações de nitrato variam muito, mostrando-se bastante inferiores

aos medidos neste trabalho experimental. Poderá ser explicado pelos diferentes métodos de extração e métodos analíticos utilizados em cada trabalho. Kmecl e Znidarčič (2015) enumeraram vários métodos analíticos para a determinação de nitratos tais como, métodos colorimétricos utilizando redução com cádmio, métodos espectrofotométricos diretos, método de cromatografia, entre outros. Contudo consideraram como o método colorimétrico com redução com cádmio o mais adequado, com resultados precisos e confiáveis, para a determinação de nitratos em amostras vegetais sendo, portanto, o método utilizado neste trabalho experimental.

O teor de nitritos (média e desvio padrão) das infusões de ervas aromáticas em estudo estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para o parâmetro nitritos (mg/100ml) para as infusões de ervas aromáticas

Condições	Manjeriçã Rubra		Sálvia Ananás		Tomilho Limão		Orégãos		Valor F	sig	
Tempo (min)	N	Média±SE	N	Média±SE	N	Média±SE	N	Média±SE			
Nitritos (mg/100mL)	10	6	0.029±0.004 ^a	3	0.026±0.001 ^{ab}	6	0.034±0.006 ^a	3	0.017±0.001 ^b	9.704	**
	20	5	0.028±0.006 ^{ab}	3	0.030±0.003 ^a	6	0.032±0.008 ^a	3	0.015±0.003 ^b	5.043	*
	Total	11	0.029±0.005 ^a	6	0.028±0.003 ^a	12	0.033±0.007 ^a	6	0.016±0.002 ^b	14.134	**
Valor F		0.095		3.574		0.120		0.893			
sig		NS		NS		NS		NS			

a-b Os números com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjeriçã rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjeriçã rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

NS – diferenças não significativas; * - diferenças estatisticamente significativas para P≤0,05; ** - diferenças estatisticamente significativas para P≤0,01; ±desvio padrão.

A concentração de nitritos (mg/100ml) nas diferentes infusões de ervas aromáticas não diferiu (P>0.05) em função do tempo de extração realizado (10 min. e 20 min.) Todavia em relação ao teor de nitritos de cada erva aromática verificou-se diferenças significativas (P≤0,05 e P≤0,01). Assim, para o tempo de extração de 10 min. verificou-se que o teor de nitritos da infusão com orégãos (0.017 mg/100ml) era idêntico à obtida com sálvia ananás (0.026 mg/100ml) mas significativamente mais baixo do que a obtida com manjeriçã rubra (0.029 mg/100ml) e com tomilho limão (0.034 mg/100ml). Quando o tempo de extração da infusão foi de 20 min. observou-se que o conteúdo de nitritos (mg/100ml) entre as várias infusões de ervas aromáticas foi diferente entre si (P≤0,05), verificando-se que o teor de nitritos da infusão com orégãos (0.015 mg/100ml) era idêntica à obtida com manjeriçã rubra (0.028 mg/100ml) mas significativamente mais baixo do que a obtida com sálvia ananás (0.030 mg/100ml) e com tomilho limão (0.032 mg/100ml). Assim, considerou-se os teores das infusões independentemente do tempo de extração (10 min. e 20 min.) verificando-se que existiam

diferenças significativas ($P \leq 0,01$) entre a infusão de orégãos (0.016 mg/100ml) com as restantes infusões com ervas aromáticas. O tomilho limão tem maior conteúdo de nitritos que as restantes infusões de ervas aromáticas e os orégãos contém o menor conteúdo de nitritos de entre todas infusões de ervas aromáticas.

Na erva aromática Manjerição Rubra obteve-se uma concentração de nitritos de 5.49 mg/kg. Outros autores, tais como, Bahadoran et al. (2016) e Özcan e Akbulut (2007) determinaram nitritos no manjerição com 6.7 mg/kg e 52.70 mg/kg, respetivamente, com métodos de extração e métodos analíticos diferentes dos realizados neste trabalho experimental.

Nas ervas aromáticas Sálvia ananás e Tomilho limão obteve-se uma média de concentração de nitritos de 5.44 mg/kg e 6.68 mg/kg, respetivamente. Özcan e Akbulut (2007), determinou para *Salvia aucheri* 8.35 mg/kg de nitritos, para a *Salvia fruticase* L 16.95 mg/kg e não detetou nitritos para *Thymbra spicata* L.

O tempo de extração (10 min. e 20 min.) não revelou diferenças significativas ($P < 0,05$) no conteúdo de nitritos e nitratos pelo que se optou, neste trabalho experimental, pela extração ao fim de 10 min. de todas as infusões de ervas aromáticas.

3.2. Avaliação da aplicação de infusões de ervas aromáticas num modelo de um produto cárneo

3.2.1. Características microbiológicas das várias formulações de produtos cárneos modelos

Os resultados da contagem de aeróbios totais a 30 °C ao longo do tempo apresentam-se no Anexo 1 (média e desvio padrão). As formulações dos produtos modelos com diferentes infusões não influenciaram ($P > 0,05$) este grupo microbiano com um registo de aproximadamente 4 log ufc/g logo após o fabrico (Dia 0). Ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C até ao dia 2 não se registou um aumento significativo dos teores deste grupo microbiano. Contudo a partir do dia 4 independentemente da formulação em estudo ocorreu um aumento significativo na contagem ($P \leq 0,05$) com valores de 6.76 a 7.71 log ufc/g (Figura 19), exceto no tratamento T5.

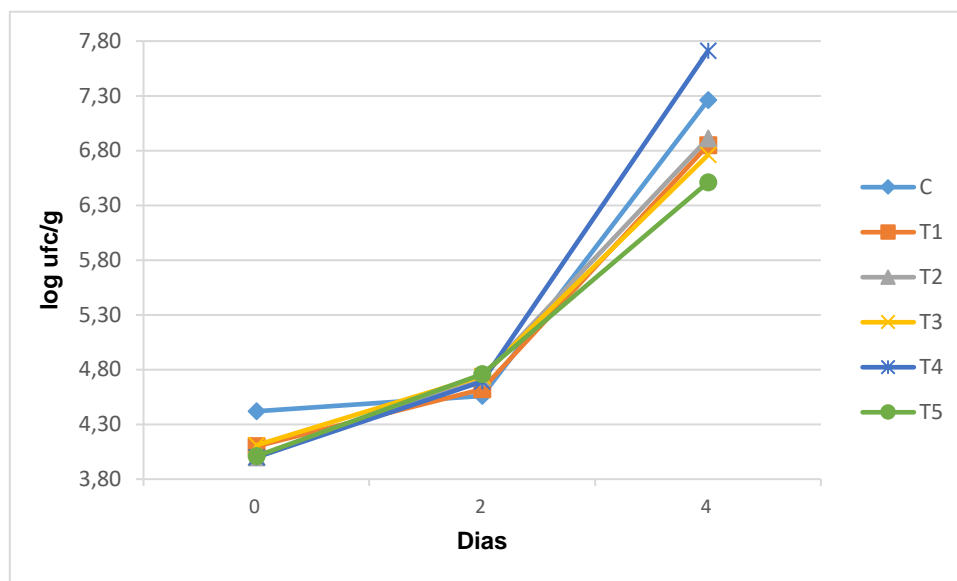


Figura 19: Contagem de Aeróbios totais a 30 °C, ao longo do tempo.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

Os microrganismos aeróbios mesófilos totais a 30 °C (AT) constituem um grupo muito importante do ponto de vista sanitário. Altas contagens estão normalmente relacionadas com baixa qualidade do produto e redução do seu prazo de validade.

Os resultados da contagem de *Enterobacteriaceae* ao longo do tempo está apresentada na Tabela 8 (média e desvio padrão).

Tabela 8: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para a contagem de *Enterobacteriaceae* ao longo do tempo nos modelos cárneos

Condições	C	T1	T2	T3	T4	T5	Valor F	Sig	
Dias	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE			
Entero	0	3.22±0.33	2.98±0.70	2.90±0.63	3.17±0.72	3.00±0.59	3.02±0.54	0.09	NS
	2	3.25±0.49	3.55±0.92	3.33±0.87	3.41±1.18	3.40±0.95	2.87±0.69	0.07	NS
	4	5.33±1.03	4.84±1.30	4.70±0.84	4.47±0.82	5.03±0.90	4.51±1.12	0.10	NS
		3.12	0.91	1.43	0.56	1.69	1.21		
		NS	NS	NS	NS	NS	NS		

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃). N=3; NS – diferenças não significativas; ± desvio padrão.

É importante fazer a determinação das *Enterobacteriaceae* porque estas constituem um indicador de qualidade higiénica de produtos processados. Os teores iniciais apresentados pelos produtos foram de aproximadamente 3 log UFC/g independentemente da infusão utilizada na formulação. Verificou-se que os valores obtidos na contagem de *Enterobacteriaceae*

tiveram um aumento de 2 log ufc/g entre o dia 0 e o dia 4, contudo esta tendência não foi significativa ($P > 0,05$).

Dentro desta família de microrganismos existem algumas espécies que apresentam especial importância como agentes patogénicos, tais como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Yersinia* spp. Este grupo é assumido como um indicador não específico de contaminação fecal ou indicia uma quebra da cadeia de refrigeração pelo que se pretende que a sua contagem seja a mais baixa possível.

Segundo diretrizes expressas no documento de Gilbert et al. (2000), relativamente às *Enterobacteriaceae*, nos produtos à base de carne fermentada (categoria 5) as contagens são consideradas satisfatórias (boa qualidade microbiológica) se a média logarítmica for inferior a 2 log ufc/g; aceitáveis (limite de qualidade microbiológica) se a média estiver entre 2 e 4 log ufc/g e não satisfatória se a média logarítmica for ≥ 4 log ufc/g.

Analisando os valores obtidos pode concluir-se que as contagens para todos os tratamentos nos dias 0 e 2, de armazenamento a 4 °C, são consideradas aceitáveis com valores entre 2.87 e 3.55 log ufc/g. Em contrapartida no dia 4 de armazenamento a 4 °C as contagens são não satisfatórias com valores entre 4.47 e 5.33 log ufc/g. Estes valores poderão ser justificados pelo facto da multiplicação das Enterobactérias e microrganismos psicrotróficos aumentar quando o valor de pH for superior a 5,8 (Mendes 2013).

Os resultados da contagem de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) ao longo do tempo está apresentada no Anexo 2 (média e desvio padrão). As formulações dos modelos cárneos com diferentes infusões não influenciaram ($P > 0,05$) este grupo microbiano com um registo de aproximadamente 2 log ufc/g logo após o fabrico (Dia 0). Ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C observou-se que até ao dia 2 não se registou um aumento significativo dos teores deste grupo. Em contrapartida no dia 4 verificaram-se diferenças significativas ($P \leq 0,05$), para os tratamentos C, T3 e T5 independentemente da formulação em estudo com valores de 3.26 a 3.95 log ufc/g (Figura 20).

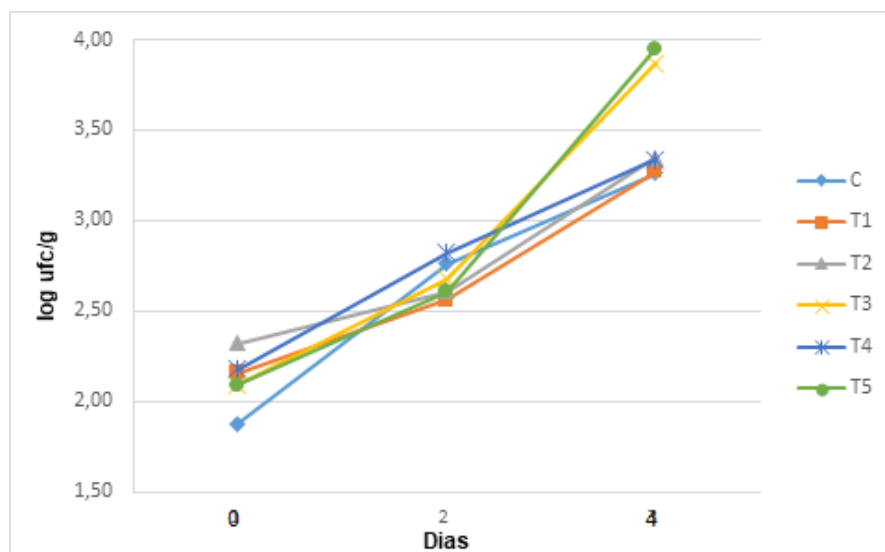


Figura 20: Contagem de bactérias ácido lácticas, ao longo do tempo.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

Nos tratamentos T1, T2 e T4, houve um aumento de 1 log ufc/g entre o Dia 0 e o Dia 4, se bem que não foi estatisticamente diferente ($P > 0,05$). O tratamento com infusão de orégãos (T5) apresentou maiores contagens de BAL no Dia 4 (3.95 log ufc/g) em comparação com os restantes tratamentos.

As espécies da família *Staphylococcaceae* para além de auxiliarem na fermentação do produto são essenciais para a estabilidade da coloração do produto final (realizam a redução de nitratos a nitritos e favorecem a formação de nitrosomioglobina).

A contagem de *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) ao longo do tempo está representada na Tabela 9 (média e desvio padrão).

Tabela 9: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para a contagem de SCN ao longo do tempo nos modelos carnes

Condições	C	T1	T2	T3	T4	T5	Valor F	Sig	
SCN	Dias	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE		
	0	3.24±0.25	3.40±0.33	3.48±0.23	3.29±0.15	3.45±0.17	3.38±0.10 ^B	0.17	NS
	2	3.56±0.30	3.67±0.19	3.89±0.23	3.79±0.37	3.71±0.34	3.63±0.21 ^{AB}	0.17	NS
	4	4.57±0.47	4.29±0.41	4.52±0.28	4.34±0.24	4.47±0.47	4.45±0.27 ^A	0.08	NS
	3.84	1.97	4.49	3.73	2.24	7.46			
	NS	NS	NS	NS	NS	*			

^{A-B} Os números com letras diferentes dentro da mesma coluna diferem significativamente.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

N=3; NS – diferenças não significativas; * - diferenças estatisticamente significativas para $P \leq 0,05$; ±desvio padrão.

As formulações dos modelos cárneos com diferentes infusões não influenciaram ($P>0,05$) este grupo microbiano com um registo de aproximadamente 3 log ufc/g logo após o fabrico (Dia 0). Ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C observou-se que até ao dia 2 não se registou um aumento significativo dos teores de SCN, verificaram-se apenas diferenças significativas ($P\leq 0,05$) no dia 4, para o tratamento T5, com valores de 4.45 log ufc/g.

Em todos os casos, mesmo não sendo estatisticamente diferente ($P>0,05$) houve uma tendência no aumento de SCN ao longo dos 4 dias de armazenamento a 4 °C.

3.2.2. Caracterização físico-química dos produtos cárneos modelo

A formulação dos produtos cárneos modelo foi realizada com a adição de sal sob a forma de cloreto de sódio. Assim, efetuou-se o seu controlo analítico e os resultados estão resumidos na Tabela 10.

Estas determinações tiveram o objetivo de verificar se o teor de cloretos se encontrava, nas amostras, dentro dos valores incorporados (1.5%) durante o fabrico das mesmas. Os valores analíticos obtidos do teor de cloretos (%) aproximaram-se do que foi estimado e incorporado no fabrico dos produtos cárneos modelo sem diferenças entre as diferentes formulações. A adição de sal a 1.5% (NaCl) desempenha essencialmente funções gustativas, facilitando a solubilidade das proteínas e reduzindo a atividade de algumas enzimas oxidativas (Ockerman and Basu 2015; Ruiz and Pérez-Palacios 2015).

Tabela 10: Média e desvio padrão dos resultados obtidos no dia 0 para o parâmetro cloretos (%) nos modelos cárneos.

Condições	C	T1	T2	T3	T4	T5	
Dias	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	
Cloretos (%)	0	1.21±0.04	1.29±0.01	1.23±0.06	1.23±0.02	1.30±0.01	1.22±0.06

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃). N=3; ±desvio padrão.

O pH dos produtos formulados variou entre 5.96 e 6.11 (Tabela 11) e não se verificaram diferenças significativas ($P>0,05$) ao longo do tempo (Dias 0, 2 e 4) nem entre tratamentos. Estes valores de pH são facilitadores da multiplicação microbiana.

Tabela 11: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para o parâmetro pH ao longo do tempo nos modelos cárneos

Condições	C	T1	T2	T3	T4	T5		
Dias	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Valor F	Sig
0	6.00±0.11	5.96±0.10	5.99±0.11	5.96±0.10	5.97±0.13	5.98±0.12	0.19	NS
2	6.01±0.13	5.99±0.12	6.02±0.11	6.00±0.11	6.00±0.13	6.01±0.11	0.08	NS
4	6.10±0.12	6.08±0.11	6.10±0.13	6.04±0.10	6.11±0.14	6.06±0.12	0.45	NS
Valor F	1.90	2.86	2.02	1.40	2.57	0.92		
Sig	NS	NS	NS	NS	NS	NS		

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃). N=9; NS – diferenças não significativas; ±desvio padrão.

Na determinação do teor de nitratos e nitritos foi calculado o limite de deteção (L.D) da técnica. Assim sendo, na próxima Tabela 12 com a apresentação dos resultados médios e desvio padrão do conteúdo de nitratos (mg/kg) e nitritos (mg/kg) ao longo do tempo, quando a designação existente é <L.D significa que o resultado médio obtido se encontra abaixo do limite de deteção da técnica (<1.03 mg/kg).

Tabela 12: Média e desvio padrão dos resultados obtidos para a conteúdo de nitratos (mg/kg) e nitritos (mg/kg) ao longo do tempo nos modelos cárneos

Condições	C	T1	T2	T3	T4	T5			
Dias	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Valor F	Sig	
Nitratos (mg/kg)	0	<L.D.	7.53±4.57	<L.D.	4.75±2.27	18.58±6.51	2.93±1.15	2.35	NS
	2	6.12±3.34	10.61±4.16	1.79±0.75	9.54±2.90	14.77±2.83	2.16±0.45	1.47	NS
	4	1.79±1.13	6.58±2.99	1.95±1.24	6.94±0.96	17.38±2.96	7.72±4.88	1.72	NS
	Valor F	0.91	0.11	0.21	0.45	0.08	0.43		
	Sig	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
Nitritos (mg/kg)	0	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	1.76	NS
	2	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	2.72	NS
	4	<L.D.	1.50±0.76	<L.D.	2.75±1.84	3.93±1.97	<L.D.	2.03	NS
	Valor F	2.64	2.37	0.34	1.33	3.77	0.01		
	Sig	NS	NS	NS	NS	NS	NS		

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃). N=3; NS – diferenças não significativas; ±desvio padrão.

Observando os valores obtidos não houve diferenças significativas ($P>0,05$) no conteúdo de nitritos (mg/kg) e nitratos (mg/kg) ao longo do tempo para cada formulação com infusões de ervas aromáticas e entre tratamentos.

O conteúdo de nitratos (mg/kg) nos produtos cárneos C e T2 encontrou-se abaixo do limite de deteção no dia 0.

Verificou-se que o teor de nitratos diminuiu do dia 2 para o dia 4, nos produtos C, T1, T3 diminuindo de 6.12, 10.61 e 9.54 mg/kg, respetivamente, para 1.79, 6.58 e 6.94 mg/kg. O produto T4 demonstrou ser o modelo carneiro com maior quantidade de nitratos (mg/kg) relativamente aos restantes tratamentos onde se verificou uma diminuição no teor de nitratos do dia 0 (18.58 mg/kg) para o dia 2 (14.77 mg/kg) seguido de um aumento do teor de nitratos do dia 2 para o dia 4 (17.38 mg/kg).

Nos produtos T2 e T5 verificou-se uma tendência de aumento no teor de nitratos do dia 2 para o dia 4, 1.79 e 2.16 mg/kg para 1.95 e 7.72 mg/kg, respetivamente.

No caso do produto carneiro C onde se quantificaram nitratos mesmo sem adição deste pode ser explicada pela equação $\text{HNO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{NO}_3^-$ que demonstra que existe formação de NO_3^- pela dissociação do HNO_3 em $\text{H}^+ + \text{NO}_3^-$, ou seja, o NO_3^- é comumente encontrado em carnes, mesmo quando não foi adicionado, como referido anteriormente (Honikel 2008; Sebranek 2009). No caso dos produtos T2, T4 e T5, onde se verificou que o teor de nitratos aumentou do dia 2 para o dia 4, mesmo sem diferenças significativas ($P>0.05$), pode ser explicado pela razão de que 10-40% do NO_2^- é oxidado em NO_3^- durante o processo de cura, havendo estas oscilações no conteúdo de nitratos ao longo do tempo (Honikel 2008).

Verificou-se que nas formulações C, T2 e T5, o teor de nitritos (mg/kg) encontrava-se abaixo do limite de deteção, em todos os momentos de análise, exceto nos produtos com as formulações T1, T3 e T4 em que apenas se quantificou nitritos no dia 4 com 1.50, 2.75 e 3.93 mg/kg, respetivamente.

Neste trabalho as amostras para a determinação do teor nitrato (mg/kg) foram analisadas aleatoriamente respeitando a performance técnica de reprodutibilidade. Contudo, sabe-se que a redução do nitrato em nitrito, para determinação do teor de nitrato, é suscetível a imprecisões na medição (Honikel 2014). Neste caso apesar de incorporarmos concentrações conhecidas (0 ppm, 70 ppm e 100 ppm) nos modelos cárneos, os resultados apresentados foram mais baixos do que o esperado, o que pode ser explicado pela razão acima mencionada, mas também pela sua redução e conjugação com a mioglobina da carne.

No caso de os valores de nitritos estarem abaixo do limite de deteção em todos os momentos de análise, exceto nos tratamentos T1, T3 e T4 em que apenas se quantificou nitritos no dia 4, é explicado pelo facto das infusões de ervas aromáticas apresentarem conteúdos de nitritos ínfimos em comparação ao seu conteúdo de nitratos.

Os diferentes produtos fabricados com diferentes infusões de ervas aromáticas foram caracterizados em relação à cor do produto final quando crus e depois após cozedura.

Os valores objetivos dos parâmetros L*a*b* que avaliaram a cor dos vários produtos cárneos modelo crus estão resumidos na Tabela 13 e as diferenças significativas dos parâmetros L*a*b*, ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C dos modelos cárneos estão apresentados na Figura 21.

Tabela 13: Média dos resultados obtidos para o parâmetro cor para os vários tratamentos de modelos cárneos crus.

Condições	C	T1	T2	T3	T4	T5	Valor F	sig	
Dias	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE			
L	0	54.38±3.31 ^a	48.18± 3.63 ^b	51.42±1.72 ^{abB}	49.49±0.91 ^b	50.69±2.68 ^b	49.42±2.40 ^{bb}	6.20	*
	2	52.99±1.11 ^a	48.14±2.19 ^{bc}	53.89±1.59 ^{aA}	46.34±4.45 ^c	51.28±1.22 ^{ab}	49.80±2.12 ^{bb}	13.08	*
	4	53.95±1.37 ^a	48.25±2.61 ^b	52.28±1.60 ^{aAB}	47.71±1.46 ^b	51.23±2.49 ^a	52.44±2.19 ^{aA}	13.62	*
	Valor F	0.98	0.003	5.25	2.97	0.19	4.86		
Sig	NS	NS	*	NS	NS	*			
a	0	10.94±1.46	10.97±1.25 ^{AB}	12.00±0.70 ^A	10.74±1.09 ^A	10.94±1.47	11.77±1.38 ^A	1.54	NS
	2	10.67±1.27	10.13±0.86 ^B	9.64±0.94 ^B	9.44±0.79 ^B	10.17±0.47	9.84±1.02 ^B	2.03	NS
	4	12.02±1.33	11.87±1.25 ^A	12.83±1.27 ^A	11.63±1.03 ^A	11.96±2.27	12.09±1.38 ^A	0.69	NS
	Valor F	2.51	5.25	24.86	11.34	2.86	8.21		
Sig	NS	**	***	*	NS	*			
b	0	9.54±1.44 ^{ac}	8.05±1.47 ^{bc}	9.18±1.15 ^{ac}	7.93±0.80 ^{bA}	10.28±1.14 ^{ac}	9.42±0.68 ^{ac}	5.63	*
	2	9.51±0.72 ^{ab}	8.08±1.35 ^b	10.28±0.83 ^a	6.50±1.07 ^{cb}	10.98±0.95 ^a	9.75±1.37 ^a	20.51	*
	4	8.75±1.20 ^{bc}	7.88±0.23 ^c	9.40±1.05 ^{ab}	7.61±0.83 ^{cA}	10.36±0.66 ^a	9.63±0.51 ^{ab}	15.22	*
	Valor F	1.36	0.08	2.90	6.13	1.48	0.28		
Sig	NS	NS	NS	*	NS	NS			

^{a-c} Os números com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente.

^{A-B} Os números com letras diferentes dentro da mesma coluna diferem significativamente.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjeriçao rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjeriçao rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

L- Luminosidade; a – Vermelho; b – Amarelo.

N=9; NS – diferenças não significativas; * - diferenças estatisticamente significativas para P ≤ 0,05; **- diferenças estatisticamente significativas para P ≤ 0,01; ***- diferenças estatisticamente significativas para P ≤ 0,001; ±desvio padrão.



Figura 21: Aparência da cor dos produtos com diferentes formulações ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C dos modelos cárneos crus.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjericão rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjericão rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

As formulações dos produtos modelos com diferentes infusões de ervas aromáticas apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$), entre os vários tratamentos, apenas para as coordenadas L* e b*. No que diz respeito à coordenada a*, não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as várias formulações com diferentes infusões.

Após fabrico (Dia 0), para a coordenada L^* , as formulações controlo (C) mostraram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) com todos os tratamentos, exceto com tratamentos incorporados com infusões de tomilho limão (T2), apresentando uma cor mais clara que as restantes, com valor médio de 54.38, contrariamente às formulações com infusões de manjerição rubra (T1) que apresentaram uma cor mais escuras com valor médio de 48.18. As formulações de manjerição rubra (T1 e T3) mostraram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) com as formulações incorporadas com sálvia ananás (T4) manifestando uma cor menos próxima do amarelo com valores médios de b^* iguais a 8.05 e 7.93, respetivamente, comparativamente às formulações com infusões de sálvia ananás (T4) que apresentaram uma cor mais próxima do amarelo com valor médio de 10.28.

Após 2 dias de armazenamento a 4 °C as formulações incorporadas com infusões de tomilho limão (T2) apresentaram-se com uma cor mais clara com valor médio de $L^* = 53.89$ e as formulações com infusões de manjerição rubra (T3) apresentaram-se como o modelo cárneo mais escuro com valor médio de $L^* 46.34$ e menos próximo da cor amarelo ($b^* = 6.50$) que as restantes formulações dos produtos modelos, comparativamente às formulações com infusões de sálvia ananás (T4) que apresentaram uma cor mais próxima do amarelo com valor médio de 10.98.

Ao fim de 4 dias de armazenamento a 4 °C as formulações com infusões de manjerição rubra (T1 e T3) apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) com as restantes formulações de produtos modelos, mostrando uma cor mais escura com valores médios de $L^* 48.25$ e 47.71, respetivamente, contrariamente ao modelo cárneo controlo (C) que apresentou uma cor mais clara com valor médio de 53.95. Novamente observou-se que as formulações com infusões de sálvia ananás (T4) demonstraram ser os modelos cárneos mais próximos da cor amarela com valor b^* médio de 10.36 com diferenças significativas ($P \leq 0,05$) com formulações com infusões de manjerição rubra (T1 e T3) com valores médios de 7.61 e 7.88, respetivamente demonstrando ser mais uma vez os produtos modelos com cor menos próxima do amarelo.

Resumindo, para a coordenada L^* , ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, observou-se que as formulações controlo (C) e formulações incorporadas com infusões de tomilho limão (T2) apresentaram-se com uma cor mais clara que as restantes contrariamente às formulações com infusões de manjerição rubra (T1 e T3) que apresentaram uma cor mais escura, isto pode ser explicado pelo facto da infusão de manjerição rubra ser a mais escura de todas as outras infusões. O aumento da luminosidade nas formulações controlo (C) e de tomilho limão (T2) que demonstraram valores de L^* superiores (cor mais clara) às restantes formulações ao longo do armazenamento a 4 °C, pode ser explicado pela menor reflexão da luz sobre o produto cárneo e que pode resultar da diminuição da capacidade de retenção de

água da carne ou pela menor ausência de pigmentos nas formulações em estudo (Magrinyà et al. 2012).

Relativamente à coordenada b^* as formulações com infusões de manjerição rubra (T1 e T3) apresentaram uma cor menos próxima do amarelo em comparação com as formulações com infusões de sálvia ananás (T4) que se apresentaram sempre com uma cor mais próxima do amarelo. As formulações com infusões de manjerição rubra (T1 e T3) que apresentaram uma cor rosa mais escura, pode ser explicado pelo facto de a infusão de manjerição rubra ser pigmentada de vermelho escuro ao contrário das outras infusões. Em contrapartida, as formulações com infusões de sálvia ananás (T4) que se apresentaram sempre com uma cor rosa mais próxima do amarelo, pode este facto ser atribuído à pigmentação amarela da infusão e eventualmente à formação de metamioglobina, proveniente da oxidação da oximioglobina pois não se usou um agente redutor na formulação, apresentando assim uma cor mais acastanhada e conseqüentemente um aumento dos valores de b^* (Maere et al. 2018).

Ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, para formulações com incorporação de manjerição rubra (T1), observou-se que até ao dia 2 não se registou um aumento significativo da coordenada a^* enquanto que no dia 4 ($a^*=11.87$) já se verificaram diferenças significativas ($P\leq 0,01$) com do dia 2 ($a^*=10.13$) demonstrando uma cor mais avermelhada, eventualmente indicativo da adição de pigmento da planta utilizada e também como resultado de eventual desenvolvimento de nitrosomioglobina devido à redução do nitrato, do dia 2 para dia 4, de 10.61 mg/kg para 6.58 mg/kg, a nitrito (1.50 mg/kg no dia 4) e conjugação do nitrosilo com a mioglobina (Pegg and Shahidi 2000; Posthuma et al. 2018).

Para as formulações com incorporação de tomilho limão (T2) observou-se que no dia 2 ($L^*=53.89$) teve diferenças significativas ($P\leq 0,05$), demonstrando ser mais claro comparativamente ao dia 0, com valor médio de 51.42. O dia 2 mostrou também diferenças significativas ($P\leq 0,001$), para a coordenada a^* , quando comparado com o dia 0 e dia 4. No dia 2 ($a^*= 9.64$) o modelo cárneo apresentava uma cor menos avermelhada que nos restantes dias, com valores médios de 12.00 após fabrico e 12.83 no dia 4 de armazenamento.

Nos modelos cárneos com incorporação de infusões de manjerição rubra (T3) no dia 2 de armazenamento a 4 °C mostrou diferenças significativas ($P\leq 0,05$), para a coordenada a^* e b^* , com o dia 0 e dia 4. Após este período de armazenamento o modelo cárneo apresentava uma cor menos avermelhada e menos próxima do amarelo que nos restantes dias (dias 0 e 4).

As formulações com infusões de orégãos (T5) no dia 4 ($L^*=52.44$) apresentavam uma cor mais clara que nos restantes dias ($P\leq 0,05$). No dia 2 de armazenamento, o produto apresentou um valor de a^* igual a 9.82 com uma cor significativamente menos avermelhada que nos restantes dias 0 e 4, com valores iguais a 11.77 e 12.09, respetivamente ($P\leq 0,05$).

Os valores L*a*b* que avaliaram a cor dos vários produtos cárneos modelo, ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, após cozedura estão resumidos na Tabela 14 sendo ilustrados pela Figura 22.

Tabela 14: Média dos resultados obtidos para os parâmetros de cor nos modelos cárneos de várias formulações cozidos

Condições	C	T1	T2	T3	T4	T5	Valor F	sig	
Dias	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE			
L	0	63.10±0.75 ^{ab}	58.87±1.05 ^c	61.98±1.67 ^{abAB}	57.57±0.88 ^{cB}	61.01±0.41 ^b	61.15±1.40 ^{bA}	30.68	**
	2	64.28±0.46 ^{aA}	59.72±1.22 ^b	60.60±0.81 ^{bB}	58.05±1.01 ^{cAB}	60.73±1.62 ^b	59.53±0.73 ^{bB}	36.11	*
	4	64.40±1.25 ^{aA}	59.39±1.48 ^{de}	62.25±0.99 ^{bA}	58.60±0.51 ^{eA}	60.36±0.76 ^{cd}	61.39±0.83 ^{bcA}	37.97	**
	Valor F	5.90	1.04	4.76	3.52	0.84	8.61		
sig	*	NS	*	*	NS	**			
a	0	6.34±0.24 ^{ab}	5.79±0.30 ^{acB}	5.62±0.53 ^{bcd}	5.94±0.35 ^{abB}	5.61±0.49 ^{bcdB}	5.77±0.45 ^{ad}	3.94	**
	2	6.74±0.40 ^{aA}	6.21±0.48 ^{abB}	5.54±0.28 ^{cd}	6.09±0.42 ^{bcB}	5.37±0.65 ^{dB}	5.41±0.44 ^d	12.76	*
	4	6.89±0.33 ^{ba}	8.93±1.52 ^{aA}	5.87±0.28 ^b	9.00±1.83 ^{aA}	9.17±1.76 ^{aA}	5.80±0.39 ^b	15.38	*
	Valor F	6.70	29.86	1.80	22.12	32.44	2.29		
sig	*	***	NS	***	***	NS			
b	0	9.16±0.19 ^b	7.97±0.21 ^{dA}	8.74±0.25 ^{CA}	7.76±0.39 ^{dA}	9.59±0.23 ^{aA}	9.02±0.23 ^{bcA}	68.66	*
	2	9.04±0.41 ^a	7.81±0.40 ^{CA}	8.32±0.24 ^{bB}	7.73±0.34 ^{CA}	8.70±0.28 ^{abB}	8.34±0.13 ^{bB}	22.87	*
	4	8.98±0.32 ^a	6.98±0.72 ^{cB}	8.48±0.20 ^{aAB}	6.75±0.62 ^{cB}	7.77±0.54 ^{bc}	8.56±0.25 ^{ab}	31.99	*
	Valor F	0.77	10.77	7.40	13.91	52.67	25.05		
sig	NS	**	**	***	***	***			

^{a-e} Os números com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente.

^{A-C} Os números com letras diferentes dentro da mesma coluna diferem significativamente.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

L- Luminosidade; a – Vermelho; b – Amarelo.

N=9; NS – diferenças não significativas; * - diferenças estatisticamente significativas para P ≤ 0,05; ** - diferenças estatisticamente significativas para P ≤ 0,01; *** - diferenças estatisticamente significativas para P ≤ 0,001; ±desvio padrão.

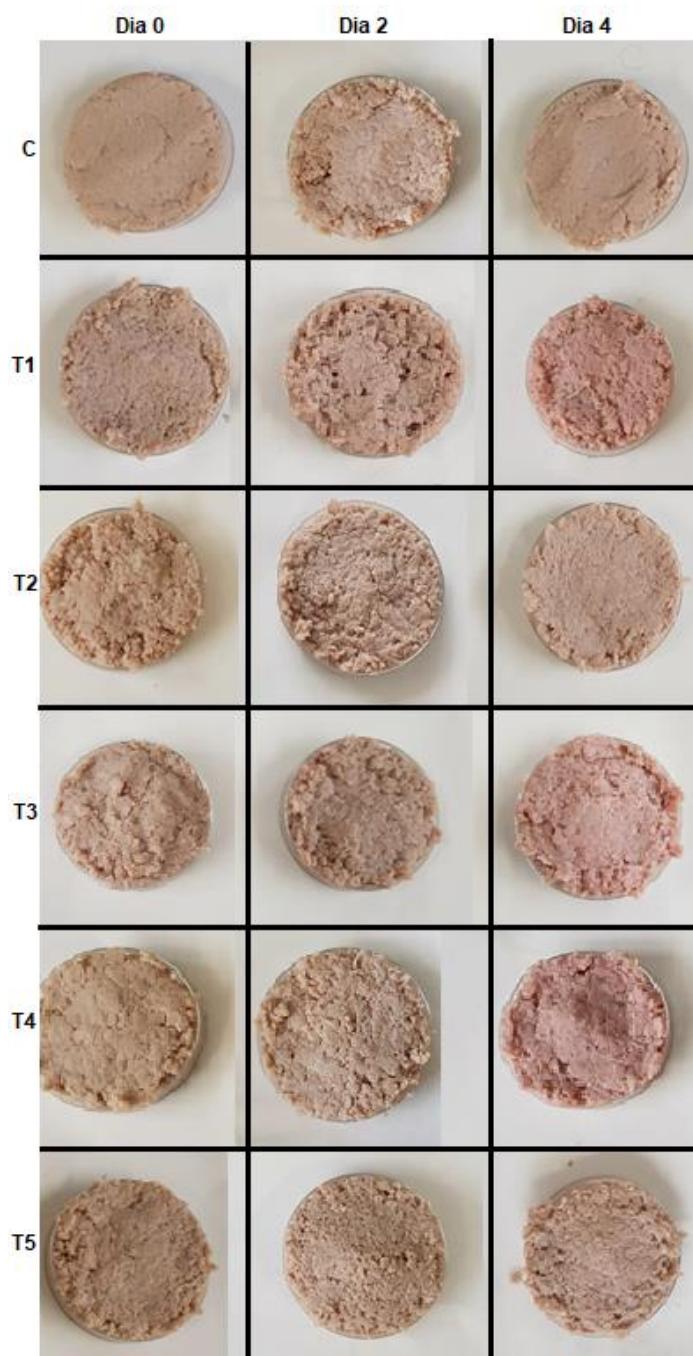


Figura 22: Aparência da cor dos produtos com diferentes formulações ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, após cozedura.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

No dia 0, parâmetro L* da cor do produto controlo (C) cozido, que se apresentou uma cor mais clara, mostrou diferenças significativas ($P \leq 0,01$) quando comparado com os produtos formulados com as diferentes infusões. Essas diferenças não se registaram quando comparado com produtos incorporados com infusões de tomilho limão (T2). Os produtos formulados com infusões de manjerição rubra (T1 e T3) apresentaram uma cor

significativamente ($P \leq 0,01$) mais escura, com valores L^* médios de 58.87 e 57.57, respetivamente.

No dia de fabrico, o produto controlo (C) quando comparado com os produtos formulados com infusões de sálvia ananás (T4) e tomilho limão (T2), apresentou uma cor mais rosada ($P \leq 0,01$) com valor a^* médio de 6.34. Os produtos formulados com sálvia ananás (T4) mostraram ter uma cor significativamente menos rosada ($a^* = 5.61$, $P \leq 0,01$). Finalizando, formulações de manjerição rubra (T1 e T3) mostraram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) com as restantes, apresentando uma cor menos próxima do amarelo com valores médios de b^* iguais a 7.97 e 7.76, respetivamente.

Após 2 dias de armazenamento a 4 °C, a cor dos produtos controlo (C) e a dos incorporados com infusões de manjerição rubra (T3) apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) com a cor dos produtos das restantes formulações. Os modelos cárneos controlo (C) apresentaram uma cor mais clara com valor médio L^* de 64.28 contrariamente aos modelos cárneos (T3) que apresentaram uma cor mais escura com valor L^* médio de 58.05. As formulações controlo (C) mostraram-se também significativamente mais rosadas ($a^* = 6.74$) e mais próximas do amarelo ($b^* = 9.04$) ($P \leq 0,05$). É interessante realçar que no parâmetro a^* o produto C foi idêntico ao produto com a formulação T1, apresentando este último um valor a^* idêntico ao produto da formulação T3 também com manjerição rubra. Os produtos formulados com sálvia ananás (T4) demonstraram um valor b^* idêntico ao produto controlo.

Ao fim de 4 dias de armazenamento a 4 °C os produtos controlo (C) apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,01$), para a coordenada L^* , com todas das restantes formulações, demonstrando uma cor significativamente mais pálida ($P \leq 0,01$) com valor L^* médio de 64.40 ao contrário das formulações com infusões de manjerição rubra (T1 e T3) que se apresentaram mais escuros com valores médios de 59.39 e 58.60, respetivamente. As formulações com sálvia ananás (T4) apresentaram-se mais rosadas ($a^* = 9.17$) não apresentando diferenças significativas ($P > 0.05$) com as formulações incorporadas com infusões de manjerição rubra (T1 e T3). As formulações com orégãos demonstraram ser as menos rosadas ($a^* = 5.80$) sem diferenças significativas ($P > 0.05$) com formulações incorporadas com infusões de tomilho limão (T2) e controlo (C). Observando a coordenada b^* as formulações incorporadas com infusões de manjerição rubra (T1 e T3) apresentaram valores idênticos (6.98 e 6.75) mas diferentes ($P \leq 0,05$) das restantes.

Por fim, os produtos com infusão de orégãos (T5) demonstraram diferenças significativas ($P \leq 0,01$) após o dia 2 de armazenamento, exibindo uma cor mais escura. Na coordenada b^* observaram-se diferenças significativas ($P \leq 0,001$) ao longo do tempo, com diminuição da cor amarela.

A cor dos produtos cárneos controlo (C) após cozedura sofreu uma descoloração ao longo do tempo com aumento dos valores L^* e b^* e diminuição a^* , contudo notou-se que os

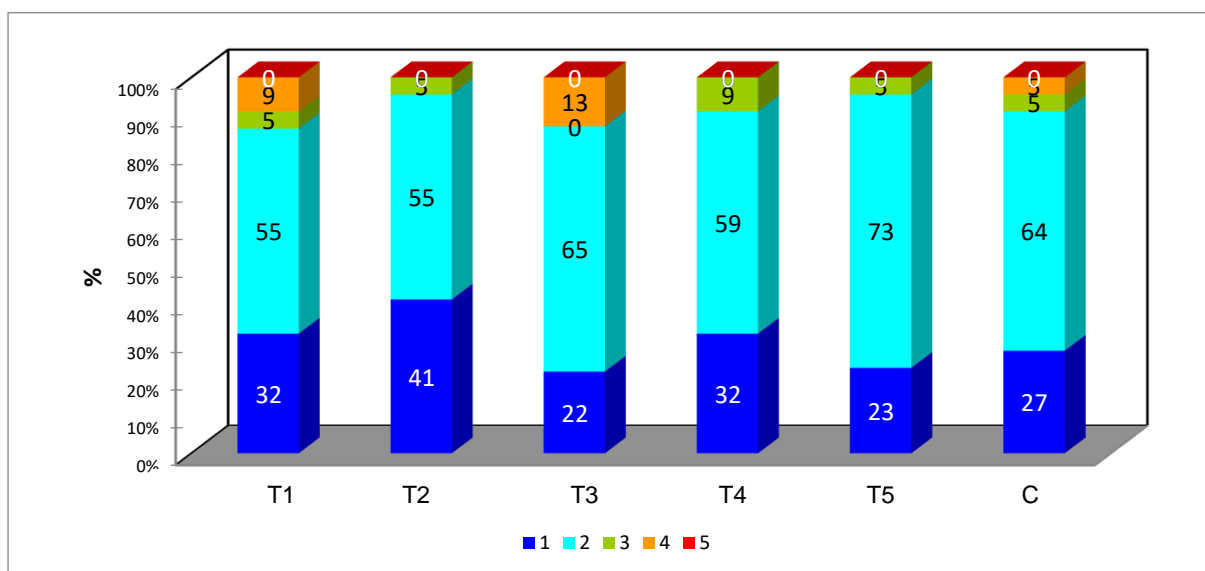
produtos formulados com sálvia ananás (T4) depois de um período de 2 para 4 dias se tornou mais rosa e semelhante a produtos que foram formulados com manjerição rubra (T1 e T3) e que apresentavam valores idênticos no teor final de nitrito (1.5 a 3.93 mg/kg).

Este aumento da cor rosa é indicativo do desenvolvimento da cor em produtos curados cozidos com formação do pigmento nitrosohemocromogénio por ação do calor (Haldane 1901; Pegg and Shahidi 2000; Posthuma et al. 2018; Olivo et al. 2018).

3.2.3. Caracterização sensorial dos produtos cárneos modelo

De acordo com o teste JAR COR (Gráfico 1) podemos observar que em todos os modelos cárneos, os provadores consideraram que a cor era fraca e muito fraca, apresentando nesses níveis (1 e 2) maiores percentagens. Nenhum modelo carneu apresentou cor muito forte (5), nem atingiu valores ideais (3) superiores ou iguais a 50%.

Gráfico 1: Distribuição (%) das categorias da escala JAR COR para os seis modelos cárneos estudados; (1 – muito fraco, 2 – fraco, 3 Ideal, 4 – forte, 5 – muito forte).



Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

Nas formulações de produto com infusões de manjerição rubra (T1 e T3), os provadores consideraram valores percentuais fracos e muito fracos de 86% e 87%, respetivamente, contudo 55% dos provadores admitiram que a cor do produto se apresentava fraca. Estas formulações exibiram uma cor cinza acastanhada, contudo a T3 apresentou-se como sendo o modelo carneu com uma cor mais escura que as restantes e a T1 a segunda cor mais escura logo a seguir à T3.

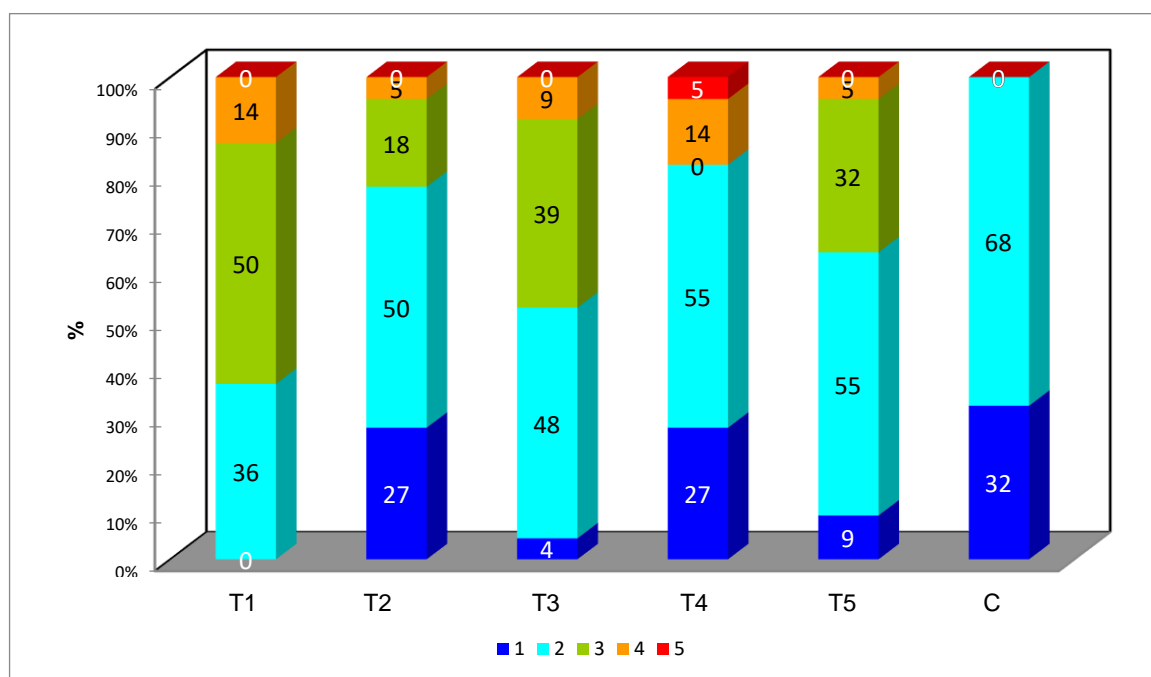
Observando as formulações com infusões de tomilho limão (T2) e orégãos (T5) os provadores consideraram valores percentuais fracos e muito fracos de 95%, contudo 55% dos provadores admitiram que a cor se apresentava fraca para os modelos cárneos com tomilho

limão e 73% para orégãos. Ambas apresentaram uma cor cinza acastanhada, semelhantes às outras formulações.

Nos produtos formulados com infusões de sálvia ananás (T4) e controlo (C) os provadores consideraram valores percentuais fracos e muito fracos de 91%, contudo 59% e 64%, respetivamente, considerou que a cor se apresentava fraca. Os produtos controlo apresentaram uma cor beije/acastanhada, menos acinzentada que a T3, sendo considerada a formulação com uma cor mais rosada comparativamente às restantes formulações.

A distribuição (%) das categorias da escala JAR CHEIRO para os seis modelos cárneos estudados estão apresentados no Gráfico 2.

Gráfico 2: Distribuição (%) das categorias da escala JAR CHEIRO para os seis modelos cárneos estudados; (1 – muito fraco, 2 – fraco, 3 Ideal, 4 – forte, 5 – muito forte).



Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjeriçãõ rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjeriçãõ rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

Nos produtos controlo (C), 100% dos inquiridos considerou o cheiro do modelo carne fraco (68%) e muito fraco (32%), definindo-o como enjoativo e pouco saboroso, com cheiro a carne de suíno, sem qualquer cheiro a ervas ou especiarias. Para os modelos cárneos com infusões de sálvia ananás (T4), 82% dos provadores consideraram esta característica como fraca (55%) a muito fraca (27%), sendo o único modelo em que 5% dos inquiridos consideraram o cheiro muito forte.

O sabor foi semelhante aos modelos cárneos controlo (C) com sabor a carne de suíno, não se notando nenhum aroma a ervas ou especiarias. Na formulação com infusão de manjeriçãõ rubra a 70 ppm (T1) 50% dos inquiridos consideraram que esta característica se

enquadra de forma ideal no produto e 36% consideraram o cheiro fraco. O aroma foi bem notado e identificado por via orto nasal, mas principalmente por via retro nasal, apreciando o cheiro deste modelo cárneo. Já para as formulações com infusão de manjerição rubra a 100 ppm (T3) 39% dos provadores consideraram esta característica como ideal e 52% admitiram um cheiro fraco (48%) e muito fraco (4%).

Nos produtos de formulações com infusão de tomilho limão (T2) e orégãos (T5), 77% e 64% dos provadores considerou esta característica respetivamente, como fraca e com valores ideais de 18% e 32% respetivamente. Nos modelos cárneos T2 não foi percebido nenhum aroma a ervas ou especiarias, exibindo sabores e cheiros neutros. Nas formulações T5, o cheiro a orégãos foi identificado quase imediatamente, considerando que a intensidade do aroma estava satisfatória.

Resumindo nenhum modelo cárneo se demonstrou ideal quanto a esta característica exceto formulações com manjerição rubra (T1), apesar de este valor se encontrar no limite do ideal ($\geq 50\%$).

Na apresentação das penalizações na média hedónica provocadas pela avaliação não ideal das características (Tabela 15), destacam-se a negrito os valores que correspondem à avaliação feita, pelo menos, com 20% dos consumidores.

Tabela 15: Valores médios da avaliação hedónica e análise de penalidades determinadas pela avaliação não ideal para os atributos analisados nas seis formulações de modelos cárneos.

Variável	Avaliação JAR	C		T1		T2		T3		T4		T5	
		%	PMH	%	PMH	%	PMH	%	PMH	%	PMH	%	PMH
Avaliação hedónica (média \pm SE)		5.05 \pm 1.50		6.00 \pm 1.54		5.41 \pm 1.26		5.91 \pm 1.44		5.18 \pm 1.53		6.05 \pm 1.13	
Penalidades													
Cor	Fraco	90.91	-0.10	86.36	-0.05	95.45	-0.43	86.96		90.91	0.90	95.45	-1.10
	Forte	4.55	1.00	9.09	0.50	0.00		13.04		0.00		0.00	
Cheiro	Fraco	100.00		36.36	1.60	77.27	0.71	52.17	0.78	81.82		63.64	0.71
	Forte	0.00		13.64	1.06	4.55	1.00	8.70	1.44	18.18		4.55	1.57

Os resultados destacados a **negrito** resultam de avaliações por, pelo menos, 20% dos consumidores.

PMH penalizações na média hedónica

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).

A apreciação hedónica dos modelos cárneos, em termos médios, encontra-se entre 5.05 e 6.05, esta apreciação média pareceu-nos aceitável, considerando a amplitude da escala hedónica (1 a 9 pontos) utilizada, pois situa-se um pouco acima do centro da escala, correspondendo sempre a apreciações positivas.

Das seis formulações de modelos cárneos, todos os modelos apresentaram características penalizadoras, exceto o controlo (C). A cor fraca nos modelos cárneos T4 apresentaram maiores penalizações na avaliação hedónica com valor de 90.91%. O cheiro fraco nas formulações T1, T2, T3 e T5, apontados por 36.36%, 77.27%, 52.17% e 63.64%

dos consumidores, respetivamente, foram os atributos que provocaram penalizações na avaliação hedónica, sendo o modelo carne T2 com a maior penalização.

Apesar das características penalizadoras na avaliação hedónica, os modelos carnes com incorporações de infusões de tomilho limão (T2) e sálvia ananás (T4), em que respetivamente, 77% e 82% dos provadores considerou o cheiro como fraco a muito fraco, não se notando nenhum aroma a ervas ou especiarias e exibindo sabores e cheiros neutros, permitem concluir que as infusões de tomilho e sálvia poderão ser candidatas para a formulação de produtos carnes curados secos como alternativa ao uso de aditivos químicos. Como referido anteriormente, as ervas aromáticas, se utilizadas em grandes quantidades podem alterar o sabor dos alimentos (Sebranek and Bacus 2007), o que não se verificou nestas duas formulações T2 e T4 ao contrário do que sucedeu com os produtos formulados com infusões de manjeriço rubra (T1 e T3) e orégãos (T5) em que o aroma foi bem notado e identificado.

4. Conclusões e considerações finais

No âmbito do presente trabalho de dissertação, pretendeu-se estudar formas de substituir o uso de aditivos químicos (nitrito e nitrato) por ingredientes naturais, tais como ervas aromáticas (Manjeriço Rubra, Tomilho Limão, Orégãos vulgar e Sálvia Ananás), tendo como objetivo a caracterização e avaliação das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de um produto carne-modelo.

Os resultados obtidos permitem-nos tecer as seguintes considerações finais:

- ❖ As infusões de manjeriço rubra e sálvia ananás mostraram ter um maior conteúdo de nitrato em comparação com infusões de tomilho limão e orégãos.
- ❖ O conteúdo de nitritos das infusões de ervas aromáticas foi substancialmente inferior ao conteúdo de nitratos. O tomilho limão apresentou maior conteúdo de nitritos que as restantes infusões de ervas aromáticas e os orégãos contêm o menor conteúdo de nitritos de entre todas infusões de ervas aromáticas estudadas neste trabalho.
- ❖ As formulações dos modelos carnes com diferentes infusões não influenciaram as contagens dos diferentes grupos microbianos que foram considerados neste estudo principalmente o grupo SCN com grande papel na redução do nitrato incorporado pelas infusões. Os modelos carnes armazenados a 4 °C apresentaram um aumento das contagens microbianas durante o período em estudo, registando-se no 2º dia de armazenamento que os modelos carnes ainda seriam aceitáveis considerando a contagem de Enterobacterias. Salienta-se ainda um aumento significativo na contagem de BAL para os modelos carnes T3 e T5

com valores de 3.87 a 3.95 log ufc/g. A contagem de SCN em todas as formulações registou um aumento ao longo dos 4 dias de armazenamento a 4 °C.

- ❖ O pH dos produtos formulados variou entre 5.96 e 6.11 e não se verificaram diferenças significativas ($P < 0,05$) ao longo do tempo (Dias 0, 2 e 4) nem entre tratamentos. Estes valores de pH são facilitadores da multiplicação microbiana.
- ❖ As concentrações de nitritos (mg/kg) e nitratos (mg/kg), nos produtos modelos cárneos, não foram significativamente diferentes nem entre formulações com infusões de ervas aromáticas nem ao longo do tempo para cada formulação ($P > 0,05$), contudo o modelo carne T4 revelou ser aquele que se apresentava com maior quantidade de nitratos (mg/kg).
- ❖ Os valores de nitritos obtidos situaram-se abaixo do limite de deteção em todos os momentos de análise, exceto nos tratamentos T1, T3 e T4 quantificando-se nitritos no dia 4. Estes resultados são explicados pelo facto das infusões de ervas aromáticas apresentaram conteúdos de nitritos ínfimos em comparação ao seu conteúdo em nitratos. Os resultados obtidos poderão estar relacionados com a redução de nitratos em nitritos nas formulações referidas.
- ❖ Quanto à determinação da cor nos modelos cárneos crus e cozidos, as formulações controlo (C) e formulações incorporadas com infusões de tomilho limão (T2) apresentaram-se com uma cor mais pálida do que as restantes contrariamente às formulações com infusões de manjerição rubra (T1 e T3) que apresentaram uma cor rosa mais escura estando este resultado relacionado com a cor da infusão de manjerição rubra, mais escura e pigmentada de vermelho em relação a todas as outras infusões.
- ❖ Nos modelos cárneos cozidos, após fabrico até ao dia 2 de armazenamento os produtos controlo (C) apresentaram uma cor mais rosada do que os produtos com sálvia ananás (T4). Após 4 dias de armazenamento os produtos com sálvia ananás (T4) foram os mais rosados e os produtos com infusão de orégãos (T5) menos rosados.
- ❖ A cor dos produtos cárneos controlo (C) após cozedura sofreu uma descoloração ao longo do tempo com aumento dos valores L^* e b^* , e diminuição a^* , contudo notou-se que os produtos formulados com sálvia ananás (T4) depois de um período de 2 para 4 dias se tornou mais rosa e semelhante a produtos que foram formulados com manjerição rubra e que apresentavam valores idênticos no teor final de nitrito (1.5 a 3.93 mg/kg).
- ❖ Na caracterização sensorial dos produtos cárneos modelo não observamos nenhuma formulação ideal. Na apreciação hedónica dos modelos cárneos, em termos médios, encontra-se entre 5.05 e 6.05, considerando aceitável. Das seis

formulações de modelos cárneos, todos os modelos apresentaram características penalizadoras, exceto o controlo (C), com cor fraca nos modelos cárneos T4 e cheiro fraco nas formulações T1, T2, T3 e T5.

A formulação com sálvia ananás, mostrou ser o modelo cárneo com maior quantidade de nitratos (mg/kg) onde se observaram alterações da cor (após cozedura) da coordenada a* no dia 4, demonstrando uma cor mais rosada/avermelhada, indicativo do desenvolvimento da cor de produtos curados cozidos (nitrosohemocromogénio). Além disso na caracterização sensorial do produto não se notou nenhum aroma a ervas ou especiarias, exibindo sabores e cheiros neutros mostrando ser uma forte candidata para novas formulações e investigações com novos condimentos, havendo uma possibilidade de aumentar a concentração de nitratos (mg/kg) visto que o cheiro e sabor foram fracos a muito fracos. Os modelos cárneos com incorporações de infusões de tomilho limão (T2) também não apresentaram nenhum aroma a ervas ou especiarias, contudo a infusão de tomilho limão apresentou menos conteúdo de nitrato não havendo nenhuma alteração de cor (coordenada a*) indicativa do desenvolvimento da cor rosada de produtos curados.

As restantes formulações com manjerição rubra e orégãos o aroma foi bem notado e identificado, logo irão interferir com os condimentos adicionados a produtos cárneos nas futuras investigações e formulações.

Estes resultados indicam que os ingredientes naturais, como a infusão de sálvia ananás, pode ser possivelmente utilizado como alternativa a aditivos químicos da cura tradicional. Contudo, é necessária mais investigação para avaliar o impacto sensorial e microbiológico deste ingrediente quando utilizado em produtos à base de carne curados com novas formulações e com a adição de novos condimentos.

Referências bibliográficas

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2005. Nitrite in cured meat. Official method 973.31. Official methods of analysis. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists International.
- Alahakoon AU, Jayasena DD, Ramachandra S, Jo C. 2015. Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. Trends in Food Science and Technology. 45(1):37–49.
- Amr A, Hadidi N. 2001. Effect of Cultivar and Harvest Date on Nitrate (NO₃) and Nitrite (NO₂) Content of Selected Vegetables Grown Under Open Field and Greenhouse Conditions in Jordan. Journal of Food Composition and Analysis. 14:59–67.
- Bahadoran Z, Mirmiran P, Jeddi S, Azizi F, Ghasemi A, Hadaegh F. 2016. Nitrate and nitrite content of vegetables, fruits, grains, legumes, dairy products, meats and processed meats. Journal of Food Composition and Analysis. 51:93–105.
- Baptista P, Venâncio A. 2003. Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. 1st ed. Forvisão–Consultoria em formação integrada, Lda, editor. Portugal; p. 1-109.
- Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, Zupancic A. 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. Journal of Ethnopharmacology. 75(2–3):125–132.
- Bedale W, Sindelar JJ, Milkowski AL. 2016. Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. Meat Science Journal. 120:85–92.
- Bedin M. 2014. Utilização de Bactérias do Ácido Láctico como Culturas Protetoras em Enchidos Fermentados Portugueses. [Dissertação de Mestrado]. Lisboa: FCT-Universidade Nova de Lisboa.
- Binkerd EF, Kolari OE. 1975. The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat. Food and Cosmetics Toxicology. 13(6):655–661.
- Blagojevic B, Antic D. 2014. Assessment of potential contribution of official meat inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef and pork carcasses. Food Control. 36(1):174–182.
- Bleotu C, Chifiriuc MC, Socolov R, Socolov D. 2018. Chapter 1, Introduction in food safety, biosecurity and hazard control. In: Holban AM, Grumezescu AM, editors. Food control and biosecurity, Handbook of Food Bioengineering. Vol. 16. United Kingdom: Elsevier; p.1-24.
- Borugă O, Jianu C, Mișcă C, Goleț I, Gruia AT, Horhat FG. 2014. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. Journal of Medicine and Life. 7(3):56–60.
- Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad JC, Gerds ML, Hammes W P, Harnett J, Huys G, Laulund S, Ouwehand A, et al. 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. International Journal of Food Microbiology. 154(3):87–97.

- Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(19):7879–7885.
- Burke KA, Lascelles J. 1975. Nitrate reductase system in *Staphylococcus aureus* wild type and mutants. *Journal of Bacteriology*. 123(1):308–316.
- Butler A. 2015. Nitrites and nitrates in the human diet: Carcinogens or beneficial hypotensive agents?. *Journal of Ethnopharmacology*. 167:105–107.
- Casaburi A, Aristoy MC, Cavella S, Di Monaco R, Ercolini D, Toldrá F, Villani F. 2007. Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*. 76(2):295–307.
- Champomier-Vergès, MC, Zagorec M. 2015. Spoilage Microorganisms: Risks and Control. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 385-388.
- Chang AC, Yang TY, Riskowski GL. 2013. Changes in nitrate and nitrite concentrations over 24h for sweet basil and scallions. *Food Chemistry*. 136(2):955–960.
- Chen BM, Wang ZH, Li SX, Wang GX, Song HX, Wang XN. 2004. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science*. 167(3):635–643.
- Cherroud S, Cachaldora A, Fonseca S, Laglaoui A, Carballo J, Franco I. 2014. Microbiological and physicochemical characterization of dry-cured Halal goat meat. Effect of salting time and addition of olive oil and paprika covering. *Meat Science*. 98(2):129–134.
- Christiansen LN, Johnston RW, Kautter DA, Howard JW, Aunan WJ. 1973. Effect of nitrite and nitrate on toxin production by *Clostridium botulinum* and on nitrosamine formation in perishable canned comminuted cured meat. *Applied Microbiology*. 25(3):357–362.
- Chung JC, Chou SS, Hwang DF. 2004. Changes in nitrate and nitrite content of four vegetables during storage at refrigerated and ambient temperatures. *Food Additives and Contaminants*. 21(4):317–322.
- Cindrić IJ, Zeiner M, Glamuzina E, Stingeder G. 2013. Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia. *Microchemical Journal*. 107:185–189.
- Cintya H, Silalahi J, Putra EDL, Siburian R. 2018. The influence of storage condition on nitrite, nitrate and vitamin C levels in vegetables. *F1000Research*. 7:1899.
- Colla G, Kim HJ, Kyriacou MC, Roupheal Y. 2018. Nitrate in fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*. 237:221-238.

- Correia M, Barroso AM, Barroso F, Soares D, Oliveira MP, Delerue-Matos C. 2010. Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. *Food Chemistry*.120:960- 966.
- Corpet DE. 2011. Red meat and colon cancer: Should we become vegetarians, or can we make meat safer?. *Meat Science*. 89(3):310–316.
- Decreto-lei 33/2008 de 25 de fevereiro. Diário da República nº39/08-I Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa
- Decreto-lei 207/2008 de 23 de outubro. Diário da República nº206-I Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa, Portugal.
- Dich J, Jivinen R, Knekt P, Penttil PL. 1996. Dietary intakes of nitrate, nitrite and NDMA in the Finish Mobile Clinic Health Examination Survey. *Food Additives and Contaminants*. 13:541–552.
- Djurković-Djaković O, Bobić B, Nikolić A, Klun I, Dupouy-Camet J. 2013. Pork as a source of human parasitic infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 19(7):586–594.
- Doel JJ, Hector MP, Amirtham CV, Al-Anzan LA, Benjamin N, Allaker RP. 2004. Protective effect of salivary nitrate and microbial nitrate reductase activity against caries. *European Journal of Oral Sciences*. 112(5):424–428.
- Doel JJ, Benjamin N, Hector MP, Rogers M, Allaker RP. 2005. Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity. *European Journal of Oral Sciences*. 113(1):14–19.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2008. Nitrate in vegetables - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *The EFSA Journal*. 689:1–79.
- Elias M, Baixinho C. 2007. Ambient conditions during production of traditional Portuguese dry sausages. *Revista de ciências agrárias*.409-423.
- Elias M, Fraqueza MJ, Barreto A. 2006. Typology of the traditional sausage production from Alentejo. *Revista Portuguesa de Zootecnia*. 1:1-10.
- [FAO/WHO] Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2009. *Codex Alimentarius: Food Hygiene*. 4th ed. 1-125.
- Fraj A, Jaâfar F, Marti M, Coderch L, Ladhari N. 2019. A comparative study of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability. *Industrial Crops and Products*. 140:1-18.
- Fraqueza MJ, Barreto AS. 2015. HACCP: Hazard analysis and critical control points. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 469–486.
- Fraqueza MJ, Borges A, Patarata L. 2018. Chapter 9, Strategies to Reduce the Formation of Carcinogenic Chemicals in Dry Cured Meat Products. In: Holban AM, Grumezescu AM editors. *Food control and biosecurity, Handbook of Food Bioengineering*. Vol. 16. United Kingdom: Elsevier; p. 295-342.

- Fraqueza MJ, Patarata L. 2020. Chapter 13, Fermented Meat Products: From the Technology to the Quality Control. In: *Sankaranarayanan A, Amaresan N, Dhanasekaran D, editors. Fermented Food Products*. 1st ed. New York: CRC press Taylor & Francis Group.
- Gangolli SD, van den Brandt P, Feron V, Janzowsky C, Koe- man J, Speijers G, Speigelhalder B, Walker R, Winshnok J. 1994. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *International Journal of Cancer*. 86(4):598–600.
- Gassara F, Kouassi AP, Brar SK, Belkacemi K. 2016. Green Alternatives to Nitrates and Nitrites in Meat-based Products—A Review. *Food Science and Nutrition*. 56(13):2133–2148.
- Gavrić T, Jurković J, Hamidović S, Haseljić S, Lalević B, Čorbo A. 2018. Yield and contents of some bioactive components of basil (*Ocimum basilicum* L.) depending on time of cutting. 28(4):192–197.
- Gilbert RJ, Louvois J, Donovan T, Little C, Nye K, Ribeiro CD, Richards J, Roberts D, Bolton FJ. 2000. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Communicable Disease and Public Health / PHLS*.3(3):163–167.
- Gomes AMCL. 2017. Influência da tecnologia de produção na qualidade e segurança de produtos de salsicharia tradicional. [Dissertação de doutoramento]. Évora: Universidade de Évora.
- Gonzalez MCM, Martínez-Tomé MJ, Isasa MET. 2010. Nitrate and nitrite content in organically cultivated vegetables. *Food Additives and Contaminants*. 3(1):19–29.
- Haldane J. 1901. The Red Colour of Salted Meat. *The Journal of Hygiene*. 1(1):115.
- Hammes WP. 2012. Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology*. 29(2):151–156.
- Hansen EB. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*. 78(1–2):119–131.
- Heaselgrave W, Andrew PW, Kilvington S. 2010. Acidified nitrite enhances hydrogen peroxide disinfection of *Acanthamoeba*, bacteria and fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65(6):1207–1214.
- Heinz G, Hautzinger P. 2007. Meat processing technology for small to medium scale producers. *Banguecoque*; p. 1-470.
- Honikel KO. 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*. 78:68–76.
- Honikel KO. 2014. Chemical analysis for specific components | Curing Agents. In: Devine C, Dikeman M, editors. *Encyclopedia of Meat Sciences*. 2nd ed. United Kingdom: Elsevier; p. 200-205.

- Hustad GO, Cerveny JG, Trenk H, Deibel RH, Kautter DA, Fazio T, Johnston, RW, Kolari OE. 1973. Effect of sodium nitrite and sodium nitrate on botulinal toxin production and nitrosamine formation in wieners. *Applied Microbiology*. 26(1):22–26.
- [IARC] International Agency for Research on Cancer. 2003. Handbooks of Cancer Prevention. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 8:1-375.
- [IARC] International Agency for Research on Cancer. 2010. Ingested nitrate and nitrite. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 94:45–110.
- [IARC] International Agency for Research on Cancer. 2018. Red Meat and Processed Meat. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 114:1-511.
- Imelouane B, Amhamdi H, Wathélet JP, Ankit M, Khedid K, El Bachiri A. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from eastern Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*. 11(2):205–208.
- Incze K. 1998. E. coli dry fermented sausage. *Meat Science*. 49(98):169–177.
- [IPCS] International Programme on Chemical Safety. 2004. Harmonization Project. Part 1: IPCS/OECD Key Generic Terms Used in Chemical Hazard/Risk Assessment. Part 2: IPCS Glossary of Key Exposure Assessment Terminology. 23(2):1-117.
- ISO 15214 .1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization, Switzerland.
- ISO 6887-2 .1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. Organization for standardization Switzerland.
- ISO 4833-1. 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization, Switzerland.
- ISO 21528-2. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method. International Organization for Standardization, Switzerland.
- Jackson AL, Sullivan GA, Kulchaiyawat C, Sebranek JG, Dickson JS. 2011. Survival and growth of *Clostridium perfringens* in commercial no-nitrate-or-nitrite-added (natural and organic) frankfurters, hams, and bacon. *Journal of Food Protection*. 74(3):410–416.
- Jin SK, Choi JS, Yang HS, Park TS, Yim DG. 2018. Natural curing agents as nitrite alternatives and their effects on the physicochemical, microbiological properties and sensory evaluation of sausages during storage. *Meat Science*. 146:34–40.

- Kasparaviciene G, Kalveniene Z, Pavilionis A, Marksiene R, Dauksiene J, Bernatoniene J. 2018. Formulation and Characterization of Potential Antifungal Oleogel with Essential Oil of Thyme. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-6.
- Kawski VL, Bertol TM, Santos MJH, Sawitzki MC, Fiorentini AM, Coldebella A, Agnes IBL. 2017. Sensory and physicochemical characteristics of salamis added with vegetable-based curing ingredients. *Ciência Rural*. 47(8):1-7.
- Kmecl V, Znidarčič D. 2015. Accreditation of the analytical method used for nitrate determination in vegetables. *Archives of Biological Sciences*. 67(1):295–302.
- Kyriacou MC, Soteriou GA, Colla G, Roupheal Y. 2019. The occurrence of nitrate and nitrite in Mediterranean fresh salad vegetables and its modulation by preharvest practices and postharvest conditions. *Food Chemistry*. 285:468–477.
- Leroy S, Lebert I, Talon R. 2015. Microorganisms in Traditional Fermented Meats. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 99-105.
- Liburdi K, Benucci I, Lombardelli C, Esti M. 2017. Identification and characterization of lipoxygenase in fresh culinary herbs. *International Journal of Food Properties*. 20(7):1470–1478.
- Lorenzo JM, Pateiro M, Domínguez R, Barba FJ, Putnik P, Kovačević DB, Shpigelman A, Granato D, Franco D. 2018. Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. *Food Research International*. 106:1095–1104.
- Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA, Benjamin N. 2004. Sources of nitrate and its circulation. *Nature reviews | microbiology*. 2(2):593-602.
- Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. 2008. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 7(2):156–167.
- Lucke FK. 1998. Fermented sausages. In: Wood BJB. *Microbiology of fermented foods*. 2nd ed. United Kingdom: Blackie Academic and professional; p. 441-483.
- Lücke FK. 2015. Quality Assurance Plan. In: Toldra, F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 487-493.
- Machnowska P, Ellerbroek L, Johne R. 2014. Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany. *Veterinary Microbiology*. 168(1):60–68.
- Maere H, Chollet S, Brabanter J, Michiels C, Paelinck H, Fraeye I. 2018. Influence of meat source, pH and production time on zinc protoporphyrin IX formation as natural colouring agent in nitrite-free dry fermented sausages. *Meat Science*. 135:46–53.
- Maganhini MB, Mariano B, Soares AL, Guarnieri PD, Shimokomaki M, Ida EI. 2007. Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) e DFD (Dark, Firm, Dry) em lombo suíno numa linha de abate industrial. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 27:69–72.

- Magrinyà N, Bou R, Rius N, Codony R, Guardiola F. 2012. Effect of fermentation time and vegetable concentrate addition on quality parameters of organic *botifarra catalana*, a cured-cooked sausage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60:6882–6890.
- Majou D, Christieans S. 2018. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat Science*. 145:273–284.
- Maldonado-Simán E, González-Ariceaga CC, Lara RR, Fallas-López M. 2018. Chapter 2, Potential Hazards and Biosecurity Aspects Associated on Food Safety. In: Holban AM, Grumezescu AM, editors. *Food Control and Biosecurity, Handbook of Food Bioengineering*. Vol. 16. United Kingdom: Elsevier; p. 25-6.
- Mantovani JR, Cruz MCP, Ferreira ME, Barbosa JC. 2005. Comparison of procedures for nitrate determination in vegetable tissue. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 40(1):53–59.
- Marcos C, Viegas C, de Almeida AM, Guerra MM. 2016. Portuguese traditional sausages: different types, nutritional composition, and novel trends. *Journal of Ethnic Foods*. 3(1):51-60.
- McNeill S, Van Elswyk ME. 2012. Red meat in global nutrition. *Meat Science*. 92(3):166–173.
- Melero B, Diez AM, Rovira J. 2015. Basic Sanitation. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 443-229.
- Mendes J. 2013. Qualidade nutricional e microbiológica dos enchidos. [Dissertação de Mestrado]. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança.
- Mensinga TT, Speijers GJA, Meulenbelt J. 2003. Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicological Reviews*. 22(1):41–51.
- Møller JKS, Skibsted LH. 2002. Nitric oxide and myoglobins. *Chemical Reviews*. 102(4):1167–1178.
- Møller JKS, Skibsted LH. 2006. Myoglobins - The link between discoloration and lipid oxidation in muscle and meat. *Quimica Nova*. 29(6):1270–1278.
- Nikmaram N, Budaraju S, Barba FJ, Lorenzo JM, Cox RB, Mallikarjunan K, Roohinejad S. 2018. Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. *Meat Science*. 145:245–255.
- NP 1845 (1982). Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor de cloretos. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 3441 (1990). Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do pH. Processo de referência. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 1847-1 (2009). Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor de nitratos. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.

- Ockerman HW, Basu L. 2015. Production and Consumption of Fermented Meat Products. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. Handbook of Fermented Meat and Poultry. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 7-12.
- Olivo R, Ribeiro L. 2018. New concepts on nitrates and nitrites. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research. 24(3):115–125.
- Ojhaa K, Kerryb JP, Duffyc G, Beresforda T, Tiwari BK. 2015. Technological advances for enhancing quality and safety of fermented meat products. Trends in Food Science & Technology. 44:105-116.
- Oostindjer M, Alexander J, Amdam GV, Andersen G, Bryan NS, Chen D, Corpet DE, De Smet S, Dragsted LO, Haug A et al. 2014. The role of red and processed meat in colorectal cancer development: A perspective. Meat Science. 97(4):583–596.
- Özcan MM, Akbulut M. 2007. Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea. Food Chemistry. 106:852–858.
- Patarata L, Saraiva G, Martins C. 1998. Processos de Fabrico de Produtos de Salsicharia Tradicional. Iª Jornadas de Queijos e Enchidos. Porto: p. 83-86.
- Parthasarathy DK, Bryan NS. 2012. Sodium nitrite: The “cure” for nitric oxide insufficiency. Meat Science. 92(3):274–279.
- Pecanac B, Djordjevic J, Baltic MZ, Djordjevic V, Nedic DN, Starcevic M, Dojcinovic S, Baltic T. 2015. Comparison of Bacteriological Status During Ripening of Traditional Fermented Sausages Filled into Different Diameter Artificial Casings. Procedia Food Science. 5:223–226.
- Pegg RB, Shahidi F. 2000. Nitrite curing of meat, the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Trumbull: Food and Nutrition Press Inc.
- Popper R, Kroll R. 2005. *Just-About-Right* scales in consumer research. Quimical Senses.7(3):3-6.
- Posthuma JA, Rasmussen FD, Sullivan GA. 2018. Effects of nitrite source, reducing compounds, and holding time on cured color development in a cured meat model system. Food Science and Technology. 95:47–50.
- Püssa T. 2013. Toxicological issues associated with production and processing of meat. Meat Science. 95(4):844–853.
- Regulamento (CE) 853/2004 de 29 de abril, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.
- Regulamento (CE) nº1881/2006, de 19 de dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia. Portugal.

- Regulamento (CE) 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008, relativo aos aditivos alimentares. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas, Bélgica.
- Regulamento (EU) nº 1129/2011, de 11 de novembro de 2011, que altera o anexo II do Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. Jornal Oficial da União Europeia. Portugal.
- Regulamento (CE) nº 231/2012, de 9 de março de 2012, que estabelece especificações para os aditivos alimentares enumerados nos anexos II e III do Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho. Jornal Oficial da União Europeia. Portugal.
- Reig M, Toldrá F. 2015. Toxic compounds of chemical origin. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. Handbook of Fermented Meat and Poultry. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 429–434.
- Riel G, Boulaaba A, Popp J, Klein G. 2017. Effects of parsley extract powder as an alternative for the direct addition of sodium nitrite in the production of mortadella-type sausages – Impact on microbiological, physicochemical and sensory aspects. *Meat Science*. 131:166–175.
- Riens B, Heldt HW. 1992. Decrease of Nitrate Reductase Activity in Spinach Leaves during a Light-Dark Transition. *Plant*. 98:573–577.
- Roila R, Branciarri R, Staccini B, Ranucci D, Miraglia D, Altissimi MS, Mercuri ML, Haouet NM. 2018. Contribution of vegetables and cured meat to dietary nitrate and nitrite intake in Italian population: Safe level for cured meat and controversial role of vegetables. *Italian Journal of Food Safety*: 7(3):168-173.
- Romans JR, Costello WJ, Carlson CW, Greaser ML, Jones KW. 2001. *The Meat We Eat*. 14th ed. USA: The Interstate Printers and Publishers, Inc.; p. 779–887.
- Roncalés P. 2015. Additives. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. Handbook of Fermented Meat and Poultry. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 69-77.
- Rovira J, Diez AM, Melero B. 2015. Processing Plant Sanitation. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. Handbook of Fermented Meat and Poultry. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 451-460.
- Rywotycki R. 2007. The effect of baking of various kinds of raw meat from different animal species and meat with functional additives on nitrosamine contamination level. *Food Chemistry*. 101(2):540–548.
- Ruiz J, and Pérez-Palacios T. 2015. Ingredients. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. Handbook of Fermented Meat and Poultry. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 55-68.
- Safefood 360°. 2013. Chemical Hazards in food safety. Whitepaper, Outubro 2013. Available from: [http:// safefood360.com/resources/Chemical-Hazards-in-Food-Safety.pdf](http://safefood360.com/resources/Chemical-Hazards-in-Food-Safety.pdf).

- Samani MR, Pirbalouti AG, Moattar F, Golparvar AR. 2019. L-Phenylalanine and bio-fertilizers interaction effects on growth, yield and chemical compositions and content of essential oil from the sage (*Salvia officinalis* L.) leaves. *Industrial Crops and Products*. 137:1–8.
- Santamaria P. 2006. Nitrate in vegetables: Toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86:10-17.
- Sareer O, Bernstein N, Ahmad S, Umar S. 2016. Genetic, Developmental and Temporal Variability in Nitrate Accumulation and Nitrate Reductase Activity in Medicinal Herb *Andrographis paniculata*. *Pedosphere*. 26(6):839–847.
- Sato K, Herring HK. 1973. The chemistry of warmed-over flavour in cooked meats. 36:1098–1102.
- Sebranek JG, Bacus JN. 2007. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?. *Meat Science*. 77:136–147.
- Sebranek JG. 2009. Chapter 1. Basic Curing Ingredients. Tarté R, editors. In: *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*. New Yorke: Springer; p.1-23.
- Sebranek JG, Jackson-Davis AL, Myers KL, Lavieri NA. 2012. Beyond celery and starter culture: Advances in natural/organic curing processes in the United States. *Meat Science*. 92:267–273.
- Shiva S, Huang Z, Grubina R, Sun J, Ringwood LA, MacArthur PH, Xu X, Murphy E, Darley-USmar VM, Gladwin MT. 2007. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circulation Research*. 100(5):654–661.
- Sindelar JJ. 2014. Natural and Organic Cured Meat Products in the United States. In: Dikeman M, Devine C, editors. 2nd ed. *Encyclopedia of Meat Sciences (Vol. 1)*. United Kingdom: Elsevier; p. 430-436.
- Sindelar JJ, Cordray JC, Olson DG, Sebranek JG, Love JA. 2007. Investigating quality attributes and consumer acceptance of uncured, no-nitrate/nitrite-added commercial hams, bacons, and frankfurters. *Journal of Food Science*. 72(8):551-559.
- Sindelar JJ, Milkowski AL. 2011. Sodium Nitrite in processed meat and poultry. *Meats: A Review of Curing and Examining the Risk / Benefit of Its Use*. American Meat Science Association (AMS). 3:1-14.
- Sindelar JJ, Milkowski AL. 2012. Nitric Oxide Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide*. 26(4):259–266.
- Skandamis P, Nychas GJE. 2015. Pathogens: Risks and Control. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 389-412.
- Skoufogianni E, Solomou AD, Danalatos NG. 2019. Ecology, cultivation and utilization of the aromatic Greek oregano (*Origanum vulgare* L.): A review. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 47(3):545-552.

- Special report. 2019. Chemical hazards in our food: EU food safety policy protects us but faces challenges. 287(02):1-65.
- Sullivan GA, Jackson-Davis AL, Schrader KD, Xi Y, Kulchaiyawat C, Sebranek JG, Dickson JS. 2012. Survey of naturally and conventionally cured commercial frankfurters, ham, and bacon for physio-chemical characteristics that affect bacterial growth. *Meat Science*. 92:808–815.
- Sonmezdag AS, Amanpour A, Kelebek H, Selli S. 2018. The most aroma-active compounds in shade-dried aerial parts of basil obtained from Iran and Turkey. *Industrial Crops and Products*. 124:692–698.
- Spiegelhalder B, Eisenbrand G, Preussmann R. 1976. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: Possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet Toxicol*. 14:545–548.
- Talon R, Walter D, Chartier S, Barrière C, Montel MC. 1999. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*. 52:47–56.
- Talon R, Leroy S. 2006. Latest Developments in meat bacterial starters. In: Toldrá F, Nollet LML, editors. *Advanced Technologies for meat processing*. 2nd ed. New York: CRC press Taylor & Francis Group; p. 401-413.
- Talon R, Leroy S, Lebert I, Giammarinaro P, Chacornac JP, Latorre-Moratalla, M, Vidal-Carou C, Zanardi E, Conter M, Lebecque A. 2008. Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 126:227–234.
- Tamme T, Reinik M, Roasto M, Meremäe K, Kiis A. 2010. Nitrate in leafy vegetables, culinary herbs, and cucumber grown under cover in Estonia: Content and intake. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*. 3(2):108–113.
- Taormina PJ. 2014. Meat and Poultry: Curing of Meat. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd Edition. United Kingdom: Elsevier; p. 501–507.
- Toldrá F, Hui YH. 2015. Dry-Fermented Sausages and Ripened Meats: An Overview. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 3-6.
- Toldrá F, Flores M, Aristoy C. 2015. Quality Control. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 461-468.
- Umar SU, Iqbal MI. 2007. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. 27:45–57.
- Vinceković M, Viskić M, Jurić S, Giacometti J, Bursać Kovačević D, Putnik P, Donsì F, Barba FJ, Režek Jambrak A. 2017. Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. *Trends in Food Science and Technology*. 69:1–12.

- Walker R. 1990. Nitrates, Nitrites and N-Nitrosocompounds: A Review of the Occurrence in Food and Diet and the Toxicological Implications. *Food Additives and Contaminants*. 7(6):717–768.
- Weightman RM, Dyer C, Buxton J, Farrington DS. 2006. Effects of light level, time of harvest and position within field on the variability of tissue nitrate concentration in commercial crops of lettuce (*Lactuca sativa*) and endive (*Cichorium endiva*). *Food Additives and Contaminants*. 23(5):462–469.
- Wu YC, Chi SP, Christieans S. 2015. Casings. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Sebranek J, Talon R, editors. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2nd ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; p. 89-96.
- Xi Y, Sullivan GA, Jackson AL, Zhou GH, Sebranek JG. 2011. Use of natural antimicrobials to improve the control of *Listeria monocytogenes* in a cured cooked meat model system. *Meat Science*. 88:503–511.
- Zhang H, Wu J, Guo X. 2016. Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. *Food Science and Human Wellness*. 5(1):39–48.

Anexo 1 - Média e desvio padrão dos resultados obtidos para a contagem de aeróbios totais a 30 °C ao longo do tempo nos modelos cárneos

Condições	C	T1	T2	T3	T4	T5			
	Dias	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Valor F	Sig
AT	0	4.42±0.15 ^B	4.10±0.31 ^B	4.00±0.25 ^B	4.11±0.26 ^B	4.00±0.32 ^B	4.01±0.32	0.29	NS
	2	4.56±0.81 ^B	4.62±0.66 ^{AB}	4.73±0.70 ^B	4.74±0.76 ^{AB}	4.69±0.83 ^B	4.76±0.82	0.01	NS
	4	7.26±0.33 ^A	6.85±0.58 ^A	6.91±0.36 ^A	6.76±0.37 ^A	7.71±0.46 ^A	6.51±0.48	0.92	NS
		9.69	7.32	9.96	7.28	11.54	4.91		
		*	*	*	*	*	NS		

^{A-B} Os números com letras diferentes dentro da mesma coluna diferem significativamente.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃). N=3; NS – diferenças não significativas; * - diferenças estatisticamente significativas para P≤ 0,05; ± desvio padrão.

Anexo 2 - Média e desvio padrão dos resultados obtidos para a contagem de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) ao longo do tempo nos modelos cárneos

Condições	C	T1	T2	T3	T4	T5	Valor F	Sig	
	Dias	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE	Média±SE			
BAL	0	1.88±0.31 ^B	2.16±0.15	2.32±0.16	2.09±0.28 ^B	2.18±0.06	2.09±0.29 ^B	0.34	NS
	2	2.76±0.08 ^{AB}	2.56±0.14	2.61±0.17	2.68±0.03 ^{AB}	2.82±0.04	2.61±0.22 ^{AB}	0.57	NS
	4	3.26±0.35 ^A	3.27±0.57	3.35±0.55	3.87±0.44 ^A	3.34±0.66	3.95±0.44 ^A	0.38	NS
		6.36	2.61	2.38	9.06	2.33	8.40		
		*	NS	NS	*	NS	*		

^{A-B} Os números com letras diferentes dentro da mesma coluna diferem significativamente.

Condições: C (Controlo 0 ppm NaNO₃); T1 (Manjerição rubra 70 ppm NaNO₃); T2 (Tomilho limão 70 ppm NaNO₃); T3 (Manjerição rubra 100 ppm NaNO₃); T4 (Sálvia ananás 100 ppm NaNO₃); T5 (Orégãos 100 ppm NaNO₃).
N=3; NS – diferenças não significativas; * - diferenças estatisticamente significativas para P≤ 0,05; ±desvio padrão.